

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLAUDEMIR DE SOUZA

**EFEITO DO CÁLCIO NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E
MIOGÊNESE DO *Rhamdia quelen* DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL E
PÓS-LARVAL**

CURITIBA

2012

CLAUDEMIR DE SOUZA

**EFEITO DO CÁLCIO NA SOBREVIVÊNCIA, CRESCIMENTO E
MIOGÊNESE DO *Rhamdia quelen* DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL E
PÓS-LARVAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Flavia Sant'Anna Rios

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA
2012

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Souza, Claudemir

Efeito do cálcio na sobrevivência, crescimento e miogênese do
Rhamdia quelen durante o desenvolvimento larval e pós-larval. /
Claudemir Souza. – Curitiba, 2012.

70 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Flavia Sant'Anna Rios

Co-orientador: Francisco Filipak Neto

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Jundia (Peixe) 2. Peixe – Larva 3. Calcio – Efeito fisiológico I. Título
II. Rios, Flavia Sant'Anna III. Filipak Neto, Francisco IV. Universidade
Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 597.52

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Prof. Dra. Flávia Sant'Anna Rios
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Prof. Dra. Sônia Regina Grötzner
Universidade Federal do Paraná (UFPR)



Prof. Dra. Viviane Prodócimo
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

E tendo como suplente,

Prof. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Após argüir o mestrando **Claudemir de Souza**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Efeito do cálcio na sobrevivência, crescimento e miogênese de *Rhombia quelen* durante o desenvolvimento larval", são de parecer favorável à APROVAÇÃO do acadêmico, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 16 de Março de 2012

DEDICATÓRIA

*A Deus e aos meus pais por tornar tudo possível,
ao Ronaldo (primo/irmão/amigo) pelo apoio
incondicional em todas as etapas do trabalho, e
por me mostrar que nossa fortaleza está em Deus;
aos amigos queridos (Alana e Danilo) pela força,
aos orientadores (Flavia e Francisco) pela
dedicação, e a todos que de uma forma ou outra
contribuíram para que este sonho se tornasse
realidade.*

AGRADECIMENTOS

Em especial, à Deus, pois sem ele nada seria possível; aos meus pais Benedito e Aparecida; aos meus irmãos, Ronaldo e Eliane; pelo apoio incondicional em todos os momentos;

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em particular ao coordenador Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade e à CAPES/REUNE, pela concessão da bolsa;

À minha orientadora Flavia Sant'Anna Rios pela dedicação, atenção, aprendizado, paciência, e, sobretudo, pela oportunidade de ingresso ao mestrado.

Ao Professor Francisco Filipak Neto pela co-orientação, amizade, ensinamentos e, pela grande atenção;

À Professora Lucélia Donatti pelo auxílio no período em que minha orientadora estava ausente;

À queridíssima Professora Sônia Grötzner por todos os ensinamentos, simpatia, carinho e atenção; e ao professor Rubens Bertazolli Filho pela atenção e sugestões.

Aos queridos amigos Alana e Danilo, por me mostrar o verdadeiro valor de uma amizade e por todo o auxílio científico e pessoal;

À querida Danielle Dietrich M. Costa, pelos ensinamentos, atenção, paciência e boa vontade que teve para comigo ao longo das várias ajudas científicas e, sobretudo, por sua amizade. E à Izabela Paulini pelo auxílio no preparo de reagentes e amizade;

Às amigas de laboratório Camila Valente Maiolino e Luciana Badeluk Cettina (Banana), pelos desabafos e por compartilhar os momentos difíceis de um trabalho científico. E aos demais colegas (Arimar, Anderson, Cíntia, Priscila, Gaby e Camille) pelo companheirismo vivido;

Ao Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUC-PR pela concessão dos ovos de jundiá, em especial aos diretores, Peter Gaberz Kirschnik e Ana Paula Baldan e ao técnico César Sary, por adequar datas e horários de desovas de acordo com minha necessidade.

Ao Laboratório de Ecotoxicologia (Professor Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro) pela concessão de água, essencial para a realização deste trabalho;

Aos Professores Iglenir Cavalli e Enilze Maria Ribeiro por permitirem a realização de extração e leitura de RNA e proteína. E a doutoranda Sarah Franco Vieira Oliveira pelo auxílio com a técnica;

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a realização deste trabalho.

SE O SOL SE POR E A NOITE CHEGAR
TU ÉS QUEM ME GUIA
SE A TEMPESTADE ME ALCANÇAR
TU ÉS MEU ABRIGO
SE O MAR ME SUBMERGIR
A TUA MÃO ME TRAZ A TONA PARA RESPIRAR
E ME FAZ ANDAR SOBRE AS ÁGUAS
TU ÉS O DEUS DA MINHA SALVAÇÃO
ÉS O MEU DONO
MINHA PAIXÃO
MINHA CANÇÃO
E MEU LOUVOR

RESUMO

A água doce possui grande variedade de íons dissolvidos, os quais variam de acordo com a região, podendo afetar positivamente ou negativamente vários processos biológicos dos peixes, tais como sobrevivência e crescimento. Um desses minerais, o cálcio, é de particular importância à vários processos celulares e fisiológicos, além de estar relacionado com a diferenciação muscular (miogênese). Sendo o cálcio um potente sinalizador, diferentes concentrações deste íon (dissolvido na água) foram avaliadas na sobrevivência, crescimento e miogênese durante o desenvolvimento larval e pós-larval de *Rhamdia quelen* (Jundiá) à 26 ± 1 °C. Para tanto, embriões desta espécie, obtidos por fertilização *in vitro*, foram incubados em diferentes tratamentos variando-se a concentração de Ca^{2+} (0, 3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L. A sobrevivência foi avaliada através do percentual dos indivíduos que resistiram até a fase pós larval (7 e 15 dias). As taxas de crescimento relativo (RGR) e protéica específica (SGR) foram determinadas pelas variações da massa corporal e do conteúdo protéico total entre os períodos de eclosão e pós-larval (7 dias). A taxa de síntese protéica de larvas e pós-larvas foi avaliada pelo cálculo da razão RNA/Proteínas. A densidade muscular foi verificada com base na variação do número das fibras musculares por área. Na ausência de Ca^{2+} na água, as larvas sofreram grande mortalidade; porém, nas demais concentrações estudadas não houve diferença significativa entre elas. As concentrações de cálcio dissolvido na água testadas (3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L) não provocaram alterações nos demais parâmetros avaliados em larvas de *Rhamdia quelen*. Entretanto, nas pós-larvas, a massa corporal apresentou uma correlação positiva com a concentração de cálcio dissolvido na água. O cálcio não causou alterações na concentração total de RNA e de proteínas, tanto em larvas, quanto em pós-larvas, entretanto a concentração total de RNA foi maior em pós-larvas com 7 dias (168 hpf) do que em larvas (~24 hpf). A razão RNA/Proteínas das pós-larvas com 7 dias foi inversamente proporcional à concentração de cálcio, bem como à massa corporal, indicando que quanto maior a concentração de cálcio, maior a síntese protéica e maior a massa corporal. Entre o período larval e pós-larval, houve perda de massa corporal nos indivíduos incubados em 3,63 e 18,18 mg Ca^{2+} /L e ganho de massa na concentração 36,36 mg Ca^{2+} /L. Entre esses mesmos períodos, houve perda de massa protéica nos indivíduos incubados em 0 mg Ca^{2+} /L, manutenção do conteúdo protéico em 3,63 mg Ca^{2+} /L e acúmulo de proteínas nas concentrações 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L. Concluiu-se que a maior densidade de fibras musculares foi observada nos indivíduos com a maior massa corporal, que foram os animais expostos a 36,36 mg Ca^{2+} /L, indicando que houve crescimento hiperplásico. Os resultados encontrados mostram que na ausência ou em baixas quantidades de cálcio, as pós-larvas de *Rhamdia quelen* sofrem degradação protéica e redução no crescimento, acarretando altas mortalidades. Porém nas maiores concentrações de cálcio, as larvas apresentam boa sobrevivência e melhor crescimento em massa e protéico, assim como melhor crescimento muscular. A melhor concentração de Ca^{2+} para a sobrevivência e crescimento de *R. quelen* é 36,36 mg Ca^{2+} /L.

Palavras-chave: Crescimento, Desenvolvimento larval, Dureza, Jundiá. Músculo. Qualidade da água.

ABSTRACT

Freshwater has a large variety of dissolved ions, which vary according to region and can affect positively or negatively various biological processes of fish such as survival and growth. One of these minerals, calcium, is of particular importance for several cellular and physiological processes, besides being related to differentiation muscle (myogenic). Since calcium is a potent signalizer, different concentrations of this ion (dissolved in water) were measured in survival, growth and myogenesis during larval and post-larval development of *Rhamdia quelen* (Jundiá) at 26 ± 1 ° C. Embryos were obtained by *in vitro* fertilization and incubated in different treatments varying the concentration of Ca^{2+} (0, 3.63, 18.18, and 36.36 mg Ca^{2+} / L. The survival was assessed by percentage of individuals who have endured to the post larval stage (7 and 15 days). Relative (RGR) and specific protein (SGR) growth rates were determined by changes in body mass and total protein content between periods hatching larvae and post-larvae (7 days). The protein synthesis rate of larvae and post larvae was evaluated by calculating the ratio RNA / protein. The muscle density was checked based on the variation in the number of muscle fibers per area. In the absence of Ca^{2+} in water, the larvae suffer high mortality, but in the other concentrations studied there was no significant difference between them. Concentrations of dissolved calcium in the water tested (3.63, 18.18, and 36.36 mg Ca^{2+} / L) caused no changes in other parameters in larvae of *R. quelen*. However, in post-larvae, body mass was significantly correlated with the concentration of dissolved calcium in water. Calcium did not alter the total concentration of RNA and protein in both larvae or in post-larvae, however, the total concentration of RNA was higher in post-larvae on day 7 (168 hpf) of larvae (~ 24 hpf). RNA / proteins ratio of post-larvae on day 7 was inversely proportional to calcium concentration and body weight, indicating that the higher the concentration of calcium, the higher the protein synthesis and the greater the body weight. Among the post-larval and larval periods, body weight loss occurred in those incubated in 3.63 Ca^{2+} and 18.18 mg / L and mass gain in Ca^{2+} concentration 36.36 mg / L. Among these same periods, there was loss of protein mass in individuals incubated in Ca^{2+} 0 mg / L, keeping the content of protein and 3 63 mg Ca^{2+} / L and the concentration of protein accumulation 18.18 and 36.36 mg Ca^{2+} / L. Increased fiber density muscle was observed in the post-larvae with the higher body mass (36.36 mg Ca^{2+} / L), indicating hyperplasic growth. The results show that in the absence or low amounts of calcium, *R. quelen* post-larvae suffer protein degradation and reduced growth, resulting in high mortality. But the highest concentrations of calcium, the larval present good survival, better growth in mass and protein as well as better muscle growth. The best concentration of Ca^{2+} to the survival and growth of *R. quelen* Ca^{2+} is 36.36 mg / L.

Keywords: Growth. Hardness. Jundiá. Larval development. Muscle.. Water quality

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 -	ESQUEMA GERAL DOS FLUXOS DE ÍONS E ÁGUA NOS TELEÓSTEOS ADAPTADOS À ÁGUA DOCE	13
FIGURA 2 -	PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO DO SOMITO	16
FIGURA 3 -	VIA REGULATÓRIA PARA DETERMINAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO MUSCULAR	17
FIGURA 4 -	PROCEDIMENTO DE EXTRUSÃO E FERTILIZAÇÃO <i>in vitro</i> EM <i>R. quelen</i>	24
FIGURA 5 -	BIOENSAIOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO	26
FIGURA 6 -	ESQUEMA REPRESENTANDO O DESENHO EXPERIMENTAL DOS BIOENSAIOS COM <i>RHAMDIA QUELEN</i>	27
FIGURA 7 -	ESTÁDIOS EM QUE AS LARVAS E PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i> FORAM AMOSTRADAS	28
FIGURA 8 -	DESENHO ESQUEMÁTICO MOSTRANDO A ALTURA APROXIMADA EM QUE FORAM REALIZADOS OS CORTES NAS PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i>	31
FIGURA 9 -	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA DE PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i> COM 168 E 360 HPF	33
FIGURA 10 -	RNA TOTAL DE LARVAS E PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i>	34
FIGURA 11 -	ANÁLISE DAS PROTEÍNAS TOTAIS DE LARVA E PÓS-LARVA DE <i>R. quelen</i>	35
FIGURA 12 -	ANÁLISE DA RAZÃO RNA/PROTEÍNAS DE LARVA E PÓS-LARVA DE <i>R. quelen</i>	35
FIGURA 13 -	MASSA CORPORAL DE LARVAS E PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i>	37
FIGURA 14 -	TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO ENTRE O PERÍODO DE ECLOSÃO E PÓS-LARVAL DE <i>R. quelen</i>	37
FIGURA 15 -	CORRELAÇÃO ENTRE RNA/PROTEÍNA E MASSA CORPORAL DE PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i>	38
FIGURA 16 -	TAXA DE CRESCIMENTO PROTÉICO ESPECÍFICO ENTRE O PERÍODO DE ECLOSÃO E PÓS-LARVAL DE <i>R. quelen</i>	39
FIGURA 17 -	CORRELAÇÃO ENTRE SGR E RGR DURANTE O DESENVOLVIMENTO LARVAL DE <i>R. quelen</i>	39
FIGURA 18 -	CORTE TRANSVERSAL DE PÓS-LARVA DE <i>R. quelen</i> UTILIZADO PARA ESTIMAR A DENSIDADE DAS FIBRAS MUSCULARES	40
FIGURA 19 -	DENSIDADE DAS FIBRAS MUSCULARES DE PÓS-LARVAS DE <i>R. quelen</i>	41
FIGURA 20 -	CORRELAÇÃO ENTRE A DENSIDADE MUSCULAR E A MASSA CORPORAL DE PÓS-LARVA DE <i>R. quelen</i>	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	INTERVALOS DE CONCENTRAÇÕES DE CaCO_3 E DO ÍON Ca^{2+} QUE CONFEREM OS PADRÕES DE DUREZA À ÁGUA	11
TABELA 2 -	EXEMPLOS DE CONCENTRAÇÕES DOS DOIS PRINCIPAIS ÍONS QUE CONFEREM DUREZA À ÁGUA	12
TABELA 3 -	COMPOSIÇÃO DA ÁGUA RECONSTITUÍDA UTILIZADA PARA A OBTENÇÃO DOS TRATAMENTOS EXPERIMENTAIS	25
TABELA 4 -	RELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE CÁLCIO, CÁLCIO E CARBONATO DE CÁLCIO	26
TABELA 5 -	DATAS E HORÁRIOS DAS DESOVAS A PARTIR DAS QUAIS SE OBTVEVE OVOS DE <i>Rhamdia quelen</i>	27
TABELA 6 -	ESTÁDIOS EM QUE AS LARVAS E PÓS-LARVAS DE <i>Rhamdia quelen</i> FORAM AMOSTRADAS	28
TABELA 7 -	NÚMERO TOTAL DAS FIBRAS MUSCULARES DE PÓS-LARVAS (168 hpf) DE <i>Rhamdia quelen</i>	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	DESOVA E FERTILIZAÇÃO	24
3.2	BIOENSAIOS E AMOSTRAGEM	25
3.3	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA	29
3.4	TAXA DE SÍNTESE PROTEICA (RAZÃO RNA/PROTEÍNA)	29
3.5	MASSA CORPORAL E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO	29
3.6	TAXA DE CRESCIMENTO PROTEICO ESPECÍFICO	30
3.7	MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES	31
3.8	ESTATÍSTICA	32
4	RESULTADOS	33
4.1	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA	33
4.2	TAXA DE SÍNTESE PROTEICA (RAZÃO RNA/PROTEÍNA)	34
4.3	MASSA CORPORAL E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO.....	36
4.4	TAXA DE CRESCIMENTO PROTEICO ESPECÍFICO	38
4.5	MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES	40
5	DISCUSSÃO.....	43
6	CONCLUSÕES.....	53
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
	ANEXO 1 - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	64
	ANEXO 2 - ESTADIAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>R. quelen</i>	65
	ANEXO 3 - PROTOCOLO DE INCLUSÃO EM PARAFINA.....	67
	ANEXO 4 – PROTOCOLO DE COLORAÇÃO HE.....	69

1 INTRODUÇÃO

Ambientes aquáticos contêm uma grande variedade de íons dissolvidos, cuja variação na concentração e combinação pode alterar as características da água. A concentração iônica é de extrema importância para a sobrevivência e crescimento de várias espécies, podendo atuar de forma positiva ou negativa (BALDISSEROTTO, 2002).

A quantidade de sais na água doce se deve às características do solo onde esta se encontra, podendo variar muito em tipo e concentração de uma região para outra, caracterizando a propriedade de dureza da água. Solos formados por rochas insolúveis, tais como os argilosos, fornecem poucos minerais à água, caracterizando a água mole. Por outro lado, solos calcários fornecem grande quantidade de sais à água, sendo esta água rica em íons denominada água dura (BALDISSEROTTO, 2002).

Os minerais mais comuns que conferem dureza à água doce são o cálcio (Ca^{2+}) e o magnésio (Mg^{2+}) (TOWNSEND *et al.*, 2003; GOLOMBIESKI *et al.*, 2005; BALDISSEROTTO *et al.*, 2009). A Tabela 1 indica intervalos de concentrações de carbonato de cálcio (CaCO_3) e do íon Ca^{2+} dissolvidos na água, caracterizando a sua dureza. A composição e quantidade desses íons podem ser diversificadas nos mais variáveis ambientes aquáticos (BALDISSEROTTO, 2002), como exemplificado na Tabela 2.

Tabela 1 – Intervalos de concentrações de CaCO_3 e do íon Ca^{2+} , que conferem os padrões de dureza à água

PADRÕES DE DUREZA	CaCO_3 (mg/L)	Ca^{2+} (mg/L)
Água mole	0 - 75	0 - 30
Água moderadamente dura	75 - 150	30 - 60
Água dura	150 - 300	60 - 120
Água muito dura	> 300	> 120

FONTE: Adaptado de Baldisserotto (2002)

Tabela 2 – Exemplos de concentrações dos dois principais íons que conferem dureza à água em alguns tipos de ambientes aquáticos

DUREZA DA ÁGUA	Ca ²⁺		Mg ²⁺	
	mM	mg/L	mM	mg/L
Água mole (Rio Negro)	0,005	0,2	0,005	0,12
Água dura	5,01	200	0,66	16
Água do mar	10,23	409	53,57	1.286
Mar morto	481	19.240	2.028	48.672

FONTE: Adaptado de Baldisserotto (2002)

Dentre esses minerais, o cálcio é de particular importância em vários eventos biológicos dos peixes e às células de um modo geral (BALDISSEROTTO *et al.*, 2009); sendo um elemento essencial para todos os animais (TSENG *et al.*, 2009). Tanto o Ca²⁺ livre quanto o iônico têm efeitos diretos sobre numerosas funções fisiológicas dos organismos, porém, em especial para as fêmeas, onde as exigências de Ca²⁺ são exacerbadas durante o ciclo reprodutivo (ALLEN *et al.*, 2009).

O íon Ca²⁺ é um mensageiro intracelular quase universal, participando de uma grande variedade de processos celulares, como regulação da expressão gênica, contração muscular e proliferação celular (BOOTMAN *et al.*, 2001). Atua também na estrutura óssea, na coagulação sanguínea, (TOWNSEND *et al.*, 2003; GOLOMBIESKI *et al.*, 2005) e numa grande variedade de processos intra e extracelulares (descritos em ZEMAN *et al.*, 1985; FLUCK, 1991; CRÉTON *et al.*, 1998; ABBINK *et al.*, 2004; COPATTI *et al.*, 2005; WHITAKER, 2006; 2008; EBERT *et al.*, 2008; WEBB, 2008; WEBB *et al.*, 2008; TSENG *et al.*, 2009).

Vale ainda ressaltar a importância do cálcio na regulação iônica dos peixes, por ter influência na permeabilidade das membranas biológicas, prevenindo o efluxo dos íons por difusão, evitando assim, altas perdas para o meio ambiente (SILVA *et al.*, 2003; 2005; COPATTI *et al.*, 2005). É ainda de extrema importância para o desenvolvimento embrionário (CRÉTON *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 2003), uma vez que muitos dos processos acima citados são essenciais durante o desenvolvimento.

Considerando que participa destes importantes processos, o cálcio tem grande importância na produtividade global dos ecossistemas aquáticos, juntamente

com outros parâmetros físicos e químicos da água que interferem no crescimento, reprodução, saúde, sobrevivência e qualidade dos peixes, podendo alavancar o sucesso na criação destes animais (ROJAS e ROCHA, 2004).

O estoque interno de cálcio nos peixes é muito restrito. Portanto, a regulação deste íon no plasma depende da ingestão pela alimentação (absorção intestinal) ou através da absorção dos íons dissolvidos na água (captação branquial), conforme esquematizado na Fig. 1 (HWANGL *et al.*, 1994; MOL *et al.*, 1999; BALDISSEROTTO, 2002; SILVA *et al.*, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2003; BALDISSEROTTO *et al.*, 2009), ou ainda por uma combinação destas, variando de acordo com a necessidade do organismo ou da disponibilidade desse mineral no ambiente (ALLEN *et al.*, 2009; FONTAGNÉ *et al.*, 2009).

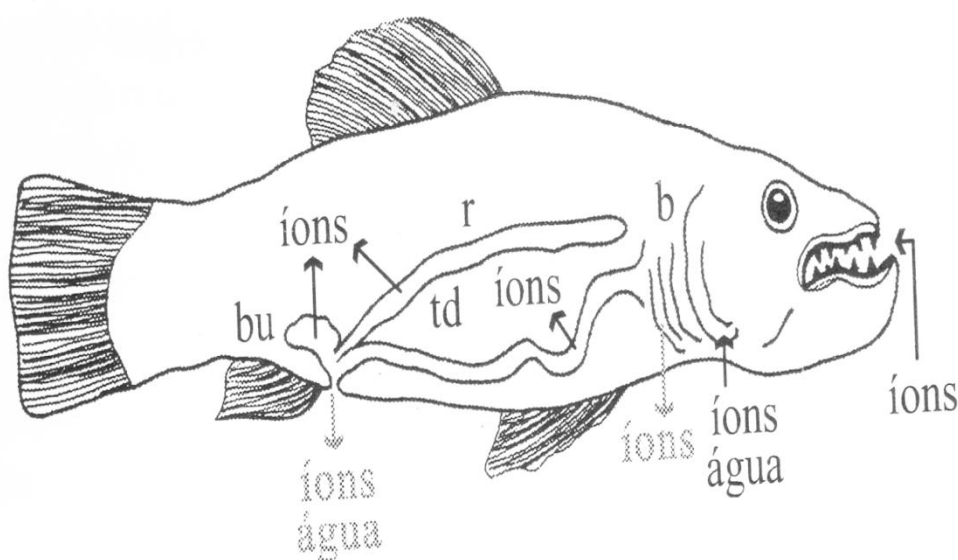


Figura 1 – Esquema geral do fluxo de íons e água nos teleósteos adaptados à água doce. As setas indicam efluxo (excreção) e influxo (absorção). Símbolos: b – brânquias; bu – bexiga urinária; r – rins; td – trato digestório. Fonte: Baldisserotto (2002).

Quando a alimentação é pobre em cálcio, os peixes suprem essa deficiência através da captação extra-intestinal, ou seja, aumentam a capacidade de absorção das brânquias, garantindo assim a assimilação da quantidade de cálcio adequada para a homeostase e crescimento (FLIK e VERBOST, 1995). Este fato mostra que a capacidade de absorção das brânquias é ajustada de acordo com a disponibilidade do cálcio a estes animais, seja pela alimentação ou pela água. Entretanto, para

muitas espécies, a única fonte de Ca^{2+} é a própria água (captação externa) (ROJAS *et al.*, 2001; ROJAS e ROCHA, 2004; TSENG *et al.*, 2009).

A captação de íons através das brânquias (captação externa) ocorre através de uma Ca^{2+} ATPase e de um cotransportador $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$ presentes nas células de cloreto (HWANGL *et al.*, 1994; MOL *et al.*, 1999; BALDISSEROTTO, 2002; SILVA *et al.*, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2003; BALDISSEROTTO *et al.*, 2009). Mas, em alguns casos, pode ocorrer através da pele, por células de cloreto distribuídas ao longo do corpo, como por exemplo, em larvas iniciais (BALDISSEROTTO, 2002). Porém, as células cloreto das brânquias são bem mais eficientes em termos de troca iônica que as cutâneas (TOWNSEND *et al.*, 2003), o que leva a conclusão de que a captação de cálcio é mais eficiente em adultos do que nas larvas.

Os peixes de água doce possuem, de modo geral, o plasma mais concentrado que o ambiente, enfrentando com isso, uma tendência à entrada excessiva de água no organismo e uma conseqüente perda iônica para o meio. Para contornar essa situação, adotam diferentes estratégias de osmorregulação, que consistem em evitar perdas excessivas de íons, maximizar a captação de íons do meio, e/ou através de mecanismos eficientes para eliminar o excesso de água (BALDISSEROTTO, 2002).

Frente a estas variações, os peixes teleósteos são denominados osmorreguladores, pois mantêm a concentração iônica do plasma constante independentemente das variações ambientais, já que os tecidos podem suportar apenas pequenas variações iônicas no meio extracelular (BALDISSEROTTO, 2002). Com isso, apresentam um rígido controle entre o influxo e efluxo de íons, incluindo o Ca^{2+} , de acordo com a disponibilidade destes no ambiente, de modo a manter os níveis iônicos constantes no plasma. Em águas moles, numa tentativa de manter o equilíbrio, aumentam o influxo (absorção de Ca^{2+}), em águas duras, para compensar a grande disponibilidade de Ca^{2+} , ocorre excreção através das brânquias, intestino e urina (FLIK e VERBOST, 1995).

É bem conhecido o papel do cálcio no processo de contração muscular (HUXLEY, 1969). Além disso, como o cálcio desempenha um papel importante na regulação de vários aspectos do metabolismo celular, pode estar também associado com a estimulação da degradação, bem como a efeitos estimulantes sobre a síntese de proteínas no músculo (ZEMAN *et al.*, 1985). Estes mecanismos podem interferir diretamente em alguns parâmetros biológicos dos peixes, visto que em situações de

estresse, como sob baixas concentrações de cálcio dissolvido na água, o crescimento e a sobrevivência das larvas de peixes são comprometidos (ABBINK *et al.*, 2004).

A maior proporção da massa corporal dos peixes é composta pela musculatura esquelética (cerca de 40-60%), demonstrando adaptação mecânica específica para a vida aquática. A musculatura dos peixes é um excelente modelo geral para estudar a estrutura e função muscular de vertebrados, uma vez que tem um arranjo muito bem estruturado, com diferentes tipos de fibras (brancas, vermelhas e rosa) (FERNÁNDEZ e CALVO, 2009), essenciais para diferentes velocidades e tempos de locomoção, sendo, ainda, altamente plásticas e adaptáveis às alterações do meio aquático (SANTOS, 2007).

De acordo com JIMENEZ *et al.* (2011) o tamanho das fibras musculares esqueléticas é uma característica fundamental que influencia a função da musculatura, como também reflete os padrões de crescimento muscular que ocorreram ao longo da vida de um organismo. O tamanho das fibras impõe restrições sobre a função do músculo, sendo que fibras maiores parecem ser favorecidas pela seleção natural. Esse favorecimento pode estar relacionado ao fato de que fibras grandes podem promover uma considerável economia no gasto energético, o qual pode ser até duas vezes mais elevado em fibras menores de juvenis quando comparados ao gasto das fibras maiores de peixes adultos. Portanto, metabolicamente, é menos dispendioso para o organismo manter as fibras maiores, o que talvez explique porque as fibras musculares estão entre as maiores células no reino animal (JIMENEZ *et al.*, 2011).

Em todos os vertebrados, a musculatura esquelética diferencia-se a partir dos somitos, que são blocos de células de origem mesodérmica, localizados nos dois lados do tubo neural (Fig. 2A) ao longo do eixo ântero-posterior (GILBERT, 2010). As células de cada somito, dependendo de sua localização no mesmo, recebem sinais de diferentes tecidos adjacentes (notocorda, tubo neural, ectoderme dorsal e mesoderme lateral) (Fig. 2B). Essa sinalização dá-se tanto por fatores indutores (como Sonic hedgehog, Wnts e Noggin), quanto inibidores (como BMP4) (COSSU e BORELLO, 1999; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007). Em resposta a estas sinalizações, ocorre a formação de três novos tecidos a partir de cada somito, o dermatomo, o miótomo e o esclerótomo (Fig. 2C), cada qual comprometido com um determinado destino (JOHNSTON, 1999; KEGLEY *et al.*, 2001; RESCAN, 2001).

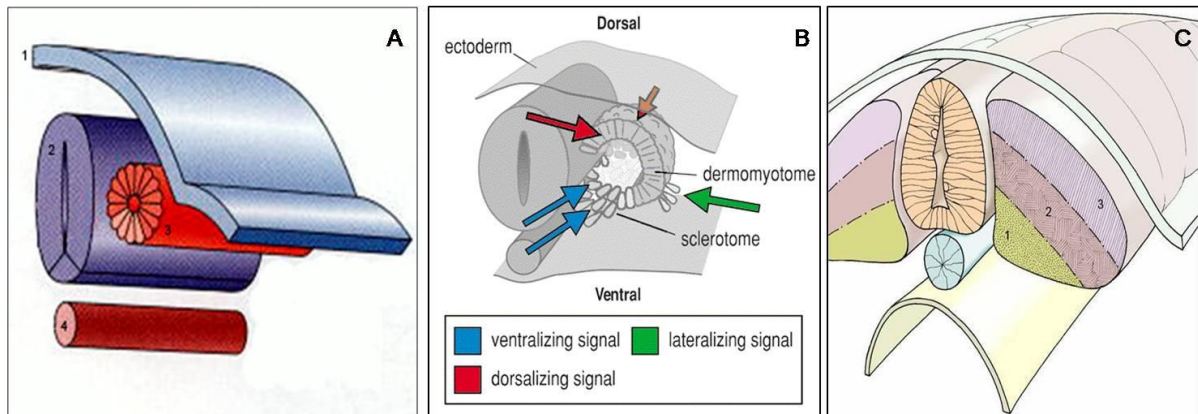


Figura 2 – Processo de diferenciação dos somitos. A) Esquema ilustrativo da localização do somito entre os tecidos indutores de sua diferenciação, 1- ectoderme, 2- tubo neural, 3- somito, 4- notocorda. B) Esquema ilustrativo das diferentes sinalizações que levam o somito a se diferenciar. C) Esquema ilustrativo dos tecidos formados pela diferenciação do somito 1 - esclerótomo, 2 - miótomo, 3 - dermatomo. Fonte: Adaptado de Gilbert (2006) (A e C) e Wolpert *et al.* (2000) (B)

Enquanto que os esclerótomos formarão os moldes cartilaginosos das vértebras e os dermatomos, a derme, os miótomos dão origem ao tecido muscular estriado esquelético (WOLPERT *et al.*, 2000; MOORE *et al.*, 2007), que pela sinalização dos tecidos adjacentes resultam na ativação dos fatores reguladores miogênicos (COSSU e BORELLO, 1999; AGUIAR, 2005).

Os fatores reguladores miogênicos (*myogenic regulatory factors* ou MRFs) compõem uma família de fatores de transcrição, que se ligam de modo similar no DNA, ativando genes músculo-específicos e, juntos, controlam a diferenciação das células musculares durante a miogênese (Fig.3), sendo altamente conservados desde peixes até mamíferos (JOHNSTON *et al.*, 2008).

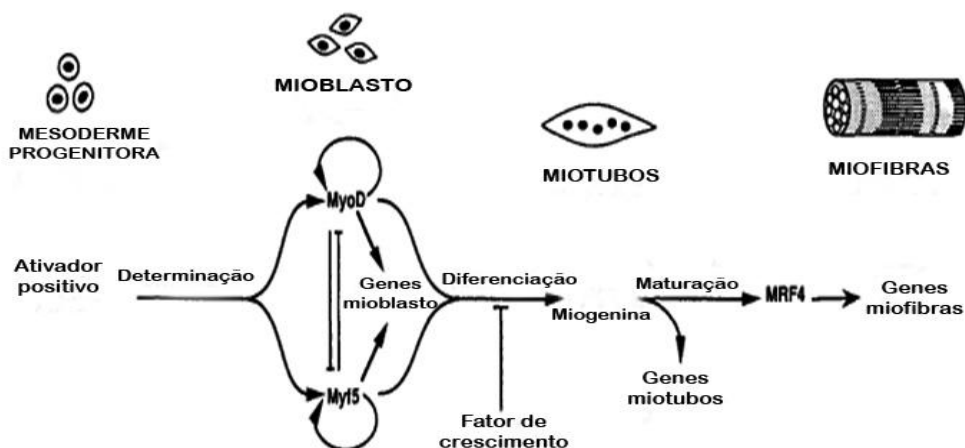


Figura 3 - Via regulatória da diferenciação muscular. MyoD ou Myf5 se expressam nas células progenitoras, formando mioblastos. Os mioblastos se proliferam até o esgotamento dos fatores de crescimento exógenos, o que leva a expressão de miogenina, que ativa genes específicos, formando os miotubos. Durante a maturação fibromuscular, diminui a expressão de miogenina e assim, a MRF4 é regulada positivamente, controlando genes característicos das miofibrilas. Fonte: Adaptado de Olson e Klein (1994).

Em resposta a essa sinalização, as células dos miótomos se tornam comprometidas com a linhagem miogênica, formando mioblastos. O processo celular de diferenciação do músculo esquelético embrionário está associado a uma série de eventos, os quais incluem: proliferação, saída do ciclo celular, migração e fusão de mioblastos. Estes processos são muito semelhantes nos diferentes grupos vertebrados (JOHNSTON, 2006) e invertebrados (MOORE *et al.*, 2007).

Após se proliferarem, os mioblastos, saem do ciclo celular e então passam a expressar outros fatores que regulam a fusão e a diferenciação da fibra muscular. Com isso, são formadas estruturas alongadas, cilíndricas e multinucleadas, denominadas miotubos, resultando em um sincício que originará a fibra muscular funcional (SCHWARTZ, 1981; JOHNSTON, 2006; VELLEMAN, 2006; MOORE *et al.*, 2007). Após estes eventos de diferenciação, os miotubos passam a conter as proteínas musculares específicas, tais como actina, miosina II e tropomiosina, sofrendo com isso mudanças estruturais e químicas o que permite o início das contrações (WOLPERT *et al.*, 2000).

Portanto, o crescimento muscular embrionário requer um equilíbrio entre proliferação e diferenciação, havendo um rígido controle de todas as etapas acima citadas. Neste processo, uma população de mioblastos normalmente não se diferencia, sendo chamados de células satélite (células tronco musculares) que ficam localizadas ao redor das fibras musculares, permanecendo em estado inativo durante toda a vida adulta, sendo solicitadas para a homeostasia, regeneração e crescimento muscular pós-natal nos peixes (POWNALL *et al.*, 2002; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007; CAO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010).

O crescimento muscular é regulado por fatores extrínsecos à célula, tais como fatores de crescimento e matriz extracelular (VELLEMAN, 2006). O ambiente celular pode atuar na diferenciação terminal substituindo os sinais intrínsecos pelos extrínsecos na expressão gênica (JOHNSTON *et al.*, 1998). Pode-se dizer que as células dos miótomos (mioblastos) são mantidas em um estado indiferenciado até serem forçadas a sair do ciclo celular e a se diferenciar em resposta a estímulos ambientais (AMTHOR *et al.*, 1999). Fatores de crescimento desempenham um papel central neste equilíbrio, visto que mantêm os mioblastos no estado proliferativo, não permitindo assim, a expressão dos genes específicos de músculo (OLSON e KLEIN, 1994). Foi constatado que reduções na concentração do fator de crescimento FGF

induzem os mioblastos a saírem do ciclo celular, sofrendo, assim, a diferenciação terminal (POWNALL *et al.*, 2002).

Em mamíferos, o número de fibras musculares é fixado logo após o nascimento, sendo que o crescimento muscular pós-natal se dá quase que exclusivamente através da hipertrofia. Por outro lado, o crescimento muscular em peixes é um processo plástico e complexo, que difere de outros vertebrados, uma vez que envolve a combinação do espessamento das fibras musculares já existentes (hipertrofia) e o recrutamento de células satélite, possibilitando o crescimento por hiperplasia (JOHNSTON *et al.*, 2000; MOMMSEN, 2001; STOIBER *et al.*, 2002; ASSIS *et al.*, 2004; VELLEMAN, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ e CALVO, 2009). Tanto a hipertrofia quanto a hiperplasia ocorrem indeterminadamente nos peixes, levando ao crescimento contínuo ao longo da vida (FERNÁNDEZ e CALVO, 2009). Sendo assim, o peso final dos peixes depende tanto da hipertrofia quanto da hiperplasia.

O processo de desenvolvimento das fibras musculares está quase completo no momento da eclosão das larvas de peixes. Nesse período, o crescimento muscular é caracterizado por um aumento no número de mioblastos por hiperplasia. Já o crescimento pós-natal das fibras ocorre principalmente através da hipertrofia. Porém, a hiperplasia é um fenômeno de extrema importância durante este período do desenvolvimento para espécies de grande porte (JOHNSTON, 1982; 1999; STICKLAND, 1983; FERNÁNDEZ e CALVO, 2009).

Em indivíduos de grande porte o crescimento é rápido e a hiperplasia é ativa durante os estádios larval e juvenil. Já em espécies de tamanho reduzido, o crescimento é lento, e neste caso, o crescimento muscular envolve principalmente a hipertrofia das fibras que foram formadas durante o desenvolvimento embrionário e larval (ALMEIDA *et al.*, 2008). Portanto, o tamanho final de uma espécie (pequeno, médio ou grande porte) é fortemente regulado pela duração da fase hiperplásica, que regula o número final de fibras musculares, que irá determinar o tamanho final do animal (FERNÁNDEZ e CALVO, 2009).

Durante o crescimento inicial, na fase de proliferação dos mioblastos, a hiperplasia pode ser determinada pela alta expressão dos fatores MyoD e Myf5. Por outro lado a expressão da miogenina e MRF4 está relacionado com a diferenciação de mioblastos e hipertrofia, sendo esta fase a mais intensa durante a fase de crescimento adulto (ALMEIDA *et al.*, 2008). A hiperplasia muscular prolongada em

algumas espécies de peixes está associada com a expressão contínua do fator de crescimento FGF6 no músculo (RESCAN, 2005).

O equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas irá modular o processo de hipertrofia, uma vez que o aumento no tamanho da fibra muscular exige taxas de síntese de proteínas maiores do que a taxa de degradação protéica, na qual o cálcio também está envolvido (VELLEMAN, 2006). Deste modo, pode-se dizer que o crescimento animal é realizado principalmente pela síntese protéica (BUCKLEY *et al.*, 1984; PELLETIER *et al.*, 1995; MOL *et al.*, 1999).

Existem evidências que apontam para uma correlação positiva entre a quantidade de RNA presente na célula e a taxa de síntese de proteínas, que, por sua vez pode ser relacionada à taxa de crescimento. Com isso, índices macromoleculares, como a razão RNA/proteína, são freqüentemente usados como indicadores de potencial da síntese protéica (HOULIHAN, 1991; HOULIHAN *et al.*, 1993) e do crescimento (MATHERS *et al.*, 1992), sendo de particular importância para a avaliação das variações recentes das condições ambientais, uma vez que refletem diferenças no crescimento durante um período de vários dias (WESTERMAN e HOLT, 1994). A análise quantitativa de ácidos nucleicos é deste modo, um método relativamente simples para estimar a taxa de crescimento recente, uma vez que as principais funções de ácido ribonucleico (RNA) envolvem síntese de proteínas (BUCKLEY, 1984).

Tem sido demonstrado que os fatores ambientais interferem tanto no crescimento hiperplásico quanto no hipertrófico (VELLEMAN, 2006; FERNÁNDEZ e CALVO, 2009). Interações entre variáveis no ambiente determinam os padrões da expressão gênica, a taxa de miogênese, a composição sub-celular das organelas e a distribuição do número e tamanho das fibras musculares. A plasticidade fenotípica no crescimento muscular possui uma relação considerável com a atividade física, a alimentação e diversos fatores ambientais; embora estas respostas possam variar de acordo com a espécie e com o estágio do desenvolvimento (JOHNSTON, 1999). Durante o período embrionário e larval, a plasticidade muscular é influenciada pelo ambiente e geralmente suas conseqüências são irreversíveis devido ao ritmo acelerado das mudanças ontogenéticas (JOHNSTON, 2006).

Dentre as variáveis ambientais que influenciam a miogênese, destaca-se o ion Ca^{2+} , que regula vários processos necessários para a diferenciação tardia do músculo (FRIDAY *et al.*, 2000). Ficou constatada a importância deste íon como

regulador dos eventos moleculares responsáveis por alterações fisiológicas da diferenciação hipertrófica, além da determinação dos tipos de fibras em células do músculo esquelético (FRIDAY e PAVLATH, 2001). O cálcio atua no crescimento muscular através da calcineurina, uma enzima dependente de cálcio capaz de induzir a miogênese, atuando como indutora da hipertrofia (DUNN *et al.*, 1999; FRIDAY *et al.*, 2000; HORSLEY *et al.*, 2001). A calcineurina e o Ca^{2+} estão envolvidos com a expressão dos fatores da regulação miogênica e diferenciação de mioblastos, atuando nos processos de alinhamento e fusão dos mioblastos (FRIDAY *et al.*, 2000; FRIDAY e PAVLATH, 2001; KEGLEY *et al.*, 2001; PARSONS *et al.*, 2003).

Deste modo, sendo o cálcio, um importante regulador da fisiologia do músculo esquelético (HORSLEY *et al.*, 2001) e sabendo-se que este íon tem um efeito relevante na sobrevivência (TOWNSEND e BALDISSEROTTO, 2001; COPATTI *et al.*, 2005) e no crescimento dos peixes (COPATTI *et al.*; SILVA *et al.*, 2005), é fundamental que níveis adequados deste íon estejam presentes na água para o cultivo com fins comerciais. Aliado a esse fato, deve-se considerar que os peixes apresentam uma variação mais intensa no crescimento muscular em resposta a fatores ambientais, do que mamíferos e aves (KOUMANS e AKSTER, 1995), de modo que condições ambientais, tais como variação na composição da água, podem ter efeitos diretos sobre os mecanismos de crescimento muscular (JOHNSTON *et al.*, 1998; JOHNSTON, 2006).

A massa muscular é a principal parte comestível dos peixes para o consumo humano, com elevada importância devido ao alto teor protéico (SANTOS, 2007; SILVA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2010). O rápido crescimento em peixes, além de ser interessante do ponto de vista comercial, também representa grande vantagem nos ambientes naturais, pois quanto menor for seu tamanho, maior será sua vulnerabilidade aos predadores (MOL *et al.*, 1999; BALDISSEROTTO, 2002). Mas, além da variação no crescimento e a consequente alteração quantitativa na produção de carne que as condições ambientais podem induzir, a plasticidade muscular está intimamente relacionada à determinação da textura e outras características da qualidade da carne, que são alvos de constante preocupação da indústria da aquicultura (JOHNSTON, 1999).

Deste modo, o conhecimento das características morfológicas, miogênicas e dinâmicas de crescimento dos peixes são parâmetros de extrema importância

quando se objetiva melhoria na produção de carne (DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007), permitindo, assim, a produção de peixes com massa muscular de alta qualidade. Com isso, o estudo envolvendo as características morfológicas e de crescimento de fibras musculares em peixes têm aumentado nos últimos anos, principalmente em espécies de crescimento rápido que alcançam grande tamanho adulto, o que inclui a maioria das espécies aquícolas com interesse comercial (DAL PAI-SILVA *et al.*, 2003). É também essencial a compreensão das interações entre a nutrição e o ambiente, bem como sobre o desenvolvimento e o crescimento do músculo em nível celular e molecular (JOHNSTON *et al.*, 2008).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie que vem se destacando na piscicultura no Sul do Brasil (GOLOMBIESK *et al.*, 2005) por ser um peixe com rápido crescimento, fácil adaptabilidade às condições de cultivo, além de possuir carne com baixo teor de gordura e poucos espinhos (GRAEFF *et al.*, 2007). Pode ainda ser facilmente induzido à reprodução com alta taxa de fecundidade (GRAEFF *et al.*, 2007) e eclosão (TOWNSEND e BALDISSEROTTO, 2001). Como a grande maioria dos peixes ósseos, o jundiá, possui fecundação externa (BALDISSEROTTO e RADÜNZ NETO, 2004) e o desenvolvimento embrionário é semelhante ao *zebrafish* (*Danio rerio*) (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009), modelo experimental para diversos estudos com teleósteos (KIMMEL *et al.*, 1995).

Uma vez que a água é o recurso natural mais importante para o produtor, por razões comerciais, os efeitos da acidificação e calagem (aumento nas concentrações de cálcio) sobre os peixes têm recebido mais atenção do que a gestão de muitos outros fatores abióticos, pois sabe-se que tais procedimentos podem melhorar a sobrevivência e crescimento dos peixes (ROJAS *et al.*, 2004; ROJAS e ROCHA, 2004).

Com base na grande importância do cálcio ao organismo e na sua relação com a sobrevivência, o crescimento e miogênese dos peixes, e, levando-se em conta que a qualidade da água é de alta relevância para a piscicultura, os níveis de cálcio dissolvidos nas águas destinadas ao cultivo devem ser o mais adequado possível (BALDISSEROTTO, 2002) para que os melhores resultados sejam alcançados. Assim, o presente estudo visou gerar novos dados que irão complementar aqueles utilizados na produção de peixes com fins comerciais, bem como contribuir com o entendimento da ecologia e da distribuição do jundiá em ambientes aquáticos com diferentes padrões de dureza. Os resultados deste

trabalho podem ainda fornecer informações relevantes a respeito dos efeitos de alterações ambientais no desenvolvimento e crescimento muscular, contribuindo, ainda, desta forma, com o estudo da biologia do desenvolvimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito de diferentes concentrações de cálcio dissolvido na água equivalentes a águas moles ou moderadamente duras (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg/L) na sobrevivência, crescimento e miogênese do jundiá, *Rhamdia quelen*, durante o desenvolvimento larval e pós-larval.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar a taxa de sobrevivência no estágio pós-larval (168 e 360 horas após a fecundação - hpf) nas concentrações de cálcio testadas;
- b. Avaliar o efeito do cálcio no ganho de peso das larvas eclodidas e pós-larvas;
- c. Verificar as taxas de crescimento relativo e crescimento protéico específico (variação na concentração de proteínas totais) entre o período larval e pós-larval, sob diferentes concentrações de cálcio na água;
- d. Avaliar o efeito do cálcio na razão RNA/Proteínas, como indicativo da taxa de síntese protéica, nas larvas eclodidas e pós-larvas;
- e. Analisar a densidade de fibras musculares das pós-larvas (168hpf) sob as diferentes concentrações de cálcio, assim como sua relação com o crescimento e a taxa de síntese protéica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DESOVA E FERTILIZAÇÃO

Os ovos de *Rhamdia quelen* (jundiá) foram obtidos no Laboratório de Pesquisas em Piscicultura da PUCPR (São José dos Pinhais – PR) por desova induzida (hipofização) e fertilização *in vitro* de exemplares machos e fêmeas sexualmente maduros (Fig. 4), de acordo com procedimentos de rotina daquele laboratório (BALDISSEROTTO, 2002). Em seguida, os ovos fertilizados foram cuidadosamente transportados em galões plásticos (5L) contendo água de poço artesiano. Foram incubados no Laboratório de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular da UFPR (Curitiba-PR), conforme descrito abaixo.

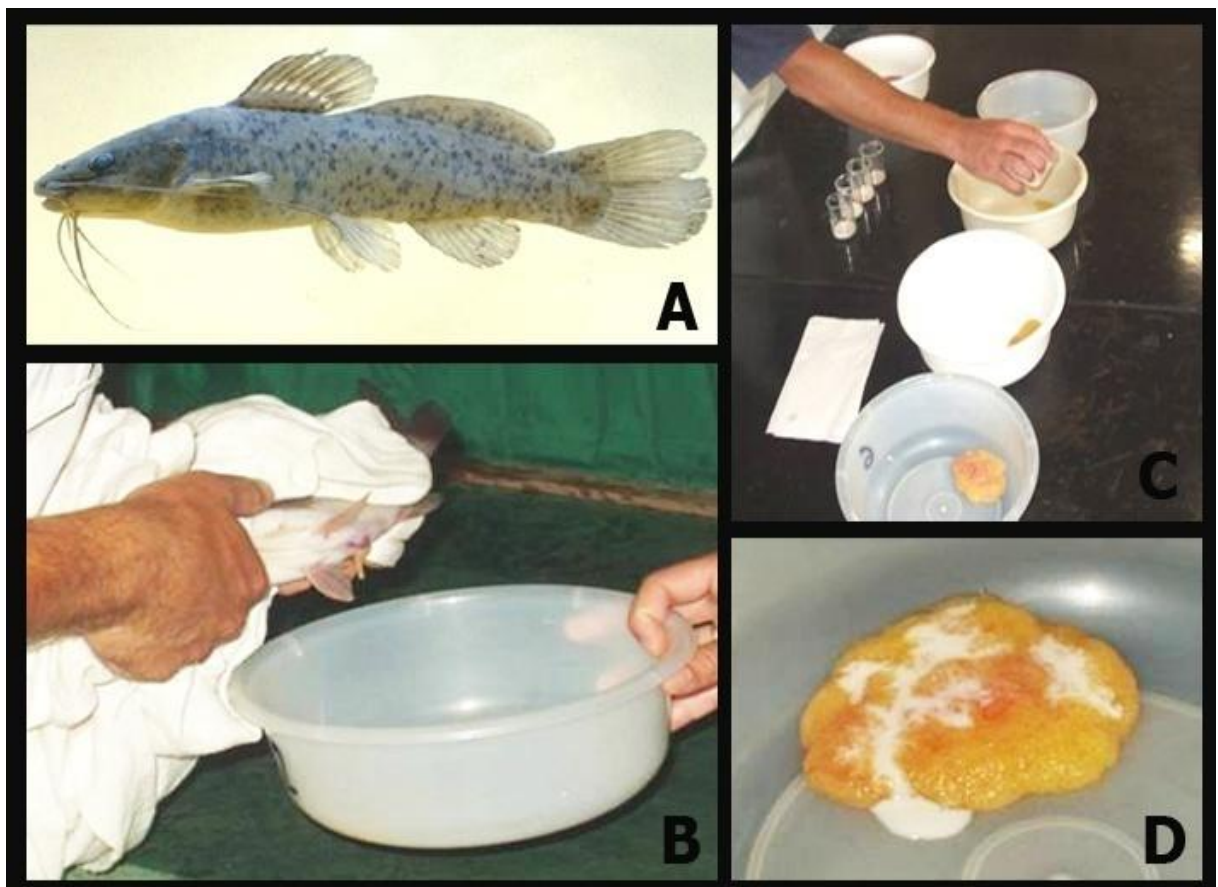


Figura 4 - Procedimento de extrusão e fertilização *in vitro* em *Rhamdia quelen* (jundiá) durante o período reprodutivo da espécie (primavera/verão) – A) Exemplar adulto (com aproximadamente 12 meses de idade). Fonte: USGS (2006). B) Extrusão dos ovócitos. C) Mistura dos gametas masculinos aos femininos. D) Ovócitos e esperma antes da hidratação. Fonte: Rodrigues-Galdino (2009).

3.2 BIOENSAIOS E AMOSTRAGEM

Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 316, Processo 23075.019887/2008-05; Anexo 1).

Duas horas após fertilização (hpf), cerca de 4500 embriões¹ no estágio de blástula E8/E9 (estadiamento de acordo com RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009, Anexo 2) foram incubados em água reconstituída (Tabelas 3 e 4) preparada de modo a se obter as concentrações de 0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg de Ca^{2+} /L, constituindo assim, os quatro tratamentos experimentais. Os embriões e larvas iniciais foram incubados até 48 hpf em caixas plásticas com capacidade para 6L (contendo 5L de água) (Fig. 5A, B e C). Após este período de incubação, as larvas foram transferidas para os aquários de vidro² (Fig. 5D) e mantidas sob as mesmas condições de exposição.

Após 72 hpf (E27+), as larvas passaram a ser alimentadas diariamente com embriões de artêmias (*Artemia* sp.) sem córion e ração comercial para alevinos. Ao 10º dia de exposição, foram realizadas trocas parciais da água (20% do volume total). Durante todo o experimento o fotoperíodo foi natural, a temperatura da água foi $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ³, o nível de oxigênio dissolvido entre 5,3 a 7,0 mg/L e pH em torno de 7,5. Esse experimento foi realizado em triplicata, sendo cada réplica realizada com ovos provenientes de uma desova diferente (Tabela 5).

¹ A quantificação dos embriões foi estimada pelo volume, sabendo-se que cada mililitro contém aproximadamente 150 embriões.

² Estas condições de transferência foram estabelecidas através de testes realizados previamente, o qual objetivou melhores condições de adaptabilidade de incubação de embriões e larvas às circunstâncias laboratoriais e também à logística laboratorial.

³ Condição previamente testada em trabalhos anteriores (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009)

Tabela 3 - Composição da água reconstituída utilizada para a obtenção dos tratamentos experimentais com as diferentes concentrações de cálcio (em mg/L)

MINERAIS (mg)	0 mg/L	3,63 mg/L	18,18 mg/L	36,36 mg/L
MgSO ₄	133,5	133,5	133,5	133,5
KCl	0,4	0,4	0,4	0,4
NaHCO ₃	10,5	10,5	10,5	10,5
CaCl ₂	0,0	10	50	100

FONTE: Adaptado de Akaishi (2003)

Tabela 4 – Relação numérica entre as concentrações de cloreto de cálcio (CaCl₂), cálcio e carbonato de cálcio utilizadas nos tratamentos experimentais com seu respectivo padrão de dureza da água

CaCl ₂ (mg/L)	[Ca ²⁺] (mg/L)	[CaCO ₃] mg/L	PADRÕES DE DUREZA DA ÁGUA*
0	0	0	Água mole
10	3,63	9	Água mole
50	18,18	45	Água mole
100	36,36	91	Água moderadamente dura

* Os padrões de dureza da água são determinados pela concentração de CaCO₃ (BALDISSEROTTO, 2002). Neste experimento foi utilizado o CaCl₂, porém com concentrações de Ca equivalentes às aquelas contidas no CaCO₃, sendo feito o cálculo pela massa atômica dos elementos químicos

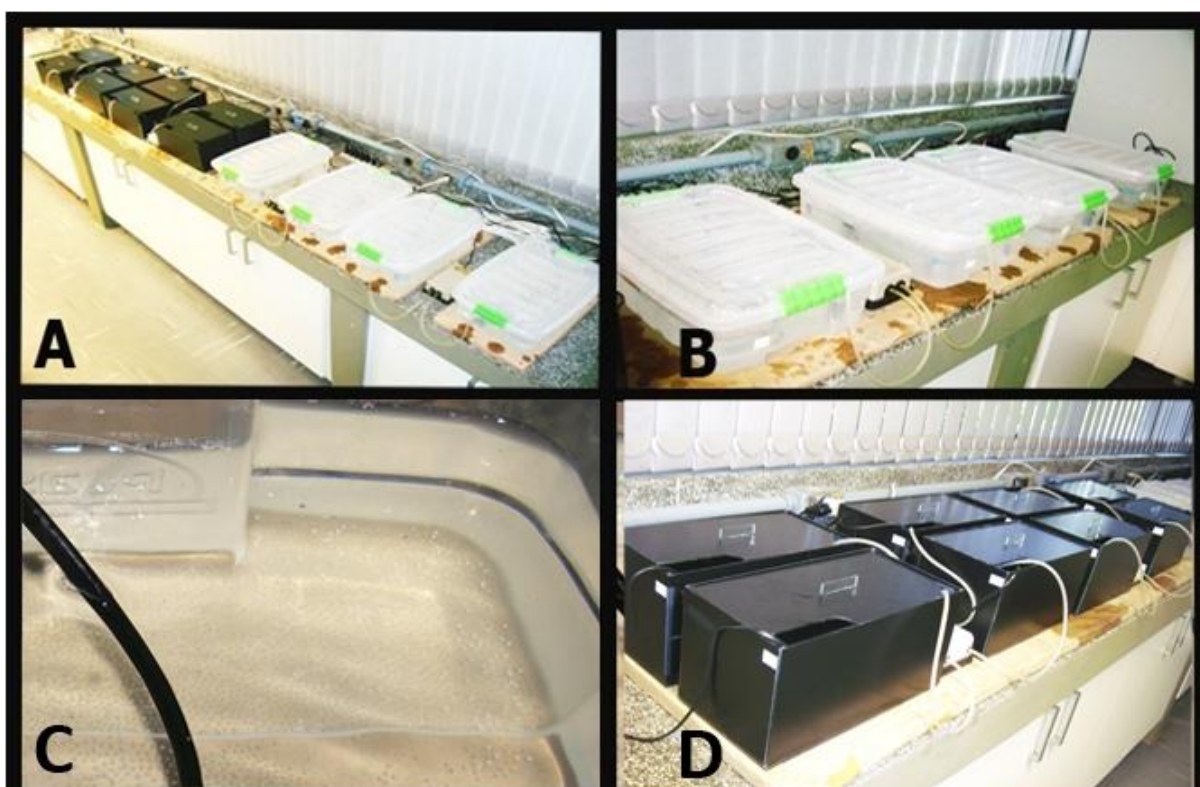


Figura 5 – Bioensaios com diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L) para incubação de embriões de *Rhamdia quelen*. A) Aquários e caixas plásticas utilizados na incubação de embriões de *Rhamdia quelen* nas diferentes concentrações de cálcio. B) Caixas plásticas usadas na incubação dos embriões e larvas até 48 hpf. C) Caixa plástica, com ovos em incubação, logo após a fertilização. D) Aquários escuros, para estocagem de larvas, usados para analisar sobrevivência e crescimento

Tabela 5. Datas e horários das desovas a partir das quais se obteve ovos de *Rhamdia quelen* e réplicas dos bioensaios realizados nas diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L)

DESOVA	DATA/HORÁRIO*	RÉPLICA**
1	06/01/2011 – 16 h	R1
2	19/01/2011 – 10 h	R2
3	04/02/2011 – 16 h 30 min	R3

* O horário indicado refere-se ao momento da fertilização. **R1, R2 e R3 são as réplicas 1, 2 e 3 respectivamente

A Fig. 6 representa esquematicamente a transferência dos organismos das caixas plásticas para os aquários, bem como a amostragem dos mesmos. Os organismos foram amostrados nos estádios de eclosão (~24 hpf, E25) e pós-larva (168 hpf, E29; Tabela 6; Fig. 7).

A Tabela 6 e a Fig. 6 indicam ainda, quais análises foram feitas e quantos indivíduos foram amostrados em cada réplica de cada tratamento.

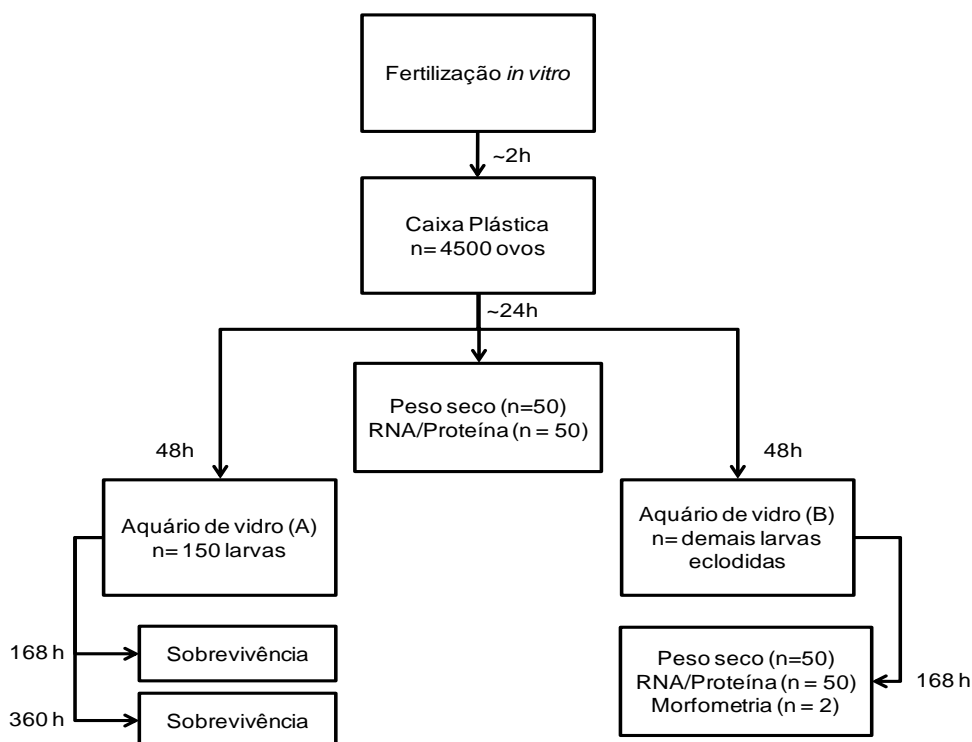


Figura 6 – Esquema representando o desenho experimental dos bioensaios com *Rhamdia quelen* incubados nas diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L), realizado para cada tratamento e cada réplica.

Tabela 6. Estádios em que as larvas e pós-larvas de *Rhamdia quelen* foram amostradas após incubação em diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L), indicando os objetivos de cada análise e tamanho amostral em cada réplica de cada situação experimental

ANÁLISES	OBJETIVOS	ESTÁDIOS
SOBREVIVÊNCIA	<ul style="list-style-type: none"> Taxa de sobrevivência 	Pós-larval (360 hpf) (n= 150)*
PESO SECO	<ul style="list-style-type: none"> Ganho/perda de massa Taxa de crescimento relativo 	Eclosão (n= 2**) e pós-larva (n= 2**)
RNA/PROTEÍNA	<ul style="list-style-type: none"> Taxa de crescimento protéico específico Taxa de síntese protéica 	Eclosão (n= 2**) e pós-larva (n= 2**)
MORFOMETRIA	<ul style="list-style-type: none"> Densidade de fibras musculares 	Pós-larva (n= 2)

n indica o número de indivíduos amostrados em cada réplica e em cada situação experimental.

*Para sobrevivência, esse número refere-se ao número inicial de indivíduos incubados (150).

**Para determinação do peso seco e razão entre RNA e proteína cada amostra corresponde a um agrupamento de 25 indivíduos

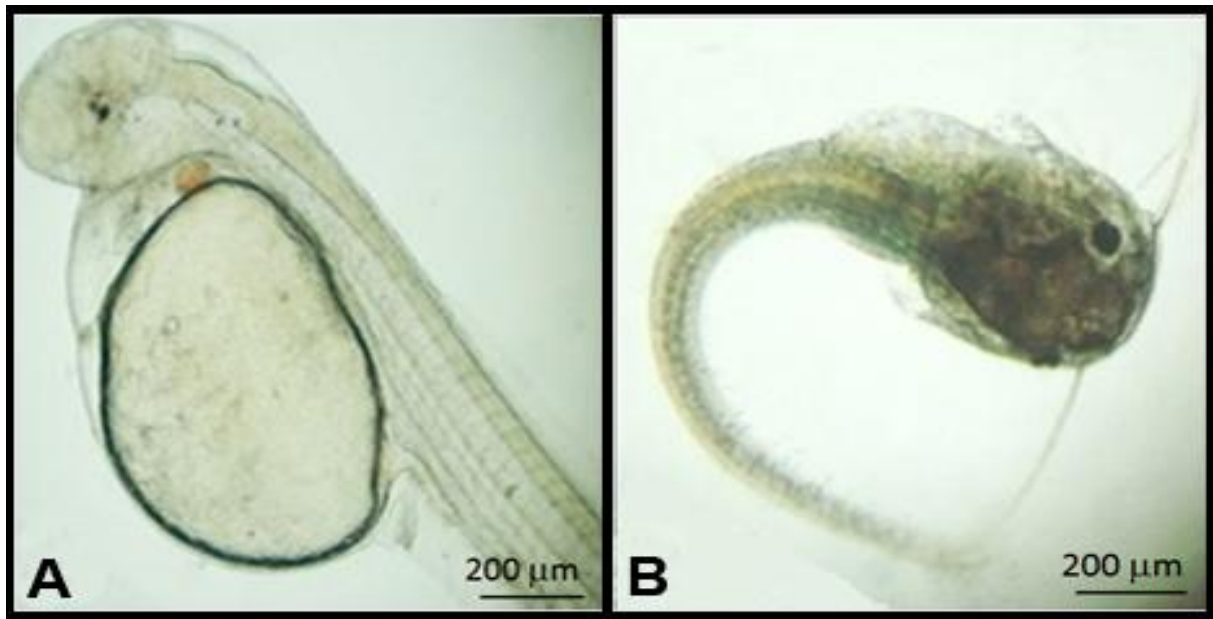


Figura 7 - Estádios em que as larvas e pós-larvas de *Rhamdia quelen* foram amostradas após incubação em diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L). A) Eclosão (~24 hpf). B) Pós-larva (168 hpf, E29)

3.3 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

A densidade de estocagem larval interfere diretamente na sobrevivência e crescimento (ROJAS *et al.*, 2001). Por isso, o experimento referente a estas análises foram conduzidos de forma isolados em relação às demais (um experimento exclusivo para sobrevivência e outro para crescimento), para as três réplicas realizadas (Fig. 6).

Para tanto, em cada réplica, 150 larvas (48 hpf) de cada situação experimental foram transferidas das caixas plásticas acima citadas para aquários de vidro (Fig. 2D) sob as mesmas condições abióticas anteriores, sendo mantidas até o período de 360 hpf. As larvas/pós larvas mortas foram retiradas e contadas a cada dois dias. Ao final dos 15 dias (360 horas), as pós-larvas restantes em cada tratamento foram quantificadas e foi calculada a porcentagem em relação ao número inicial de indivíduos. Para análise, foi considerada a mortalidade nos estádios de 168 hpf (7 dias; E29) e 360hpf (15 dias; E29+).

3.4 TAXA DE SÍNTESE PROTÉICA (RAZÃO RNA/PROTEÍNA)

Para extração e quantificação de RNA e proteínas totais, as amostras de cada tratamento e cada réplica, cada uma contendo um *pool* de 25 indivíduos (Tabela 6), foram congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C até o processamento. As amostras foram pesadas, homogeneizadas e submetidas à extração do RNA e proteínas totais através do Kit de extração múltipla RNA/Proteína AllPrep da Quiagen®, conforme as orientações do fabricante. A quantificação se deu em espectrofotômetro (Nanodrop ND1000) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm para RNA e proteínas, respectivamente.

3.5 MASSA CORPORAL E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO

Para determinação da massa corporal (peso seco) dos indivíduos e a taxa de crescimento relativo, as amostras (Tabela 6) de cada situação experimental foram transferidas para cadinhos de cerâmica e congelados a -20 °C. Posteriormente, foram submetidos à desidratação, sendo para tanto, mantidas a 105°C e pesadas a cada 24h até a estabilização do peso (48 horas). A taxa de crescimento relativo foi calculada de acordo com Ricker (1958), utilizando-se a seguinte equação:

$$RGR = (e^{G_m} - 1) \times 100 \quad (\% \cdot d^{-1})$$

$$\text{sendo, } G_m = \frac{\ln m_{t_2} - \ln m_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

onde:

RGR = taxa de crescimento relativo

m = peso seco das amostras medidas em t_1 e t_2 (mg).

t_1 e t_2 = tempo de desenvolvimento dos indivíduos (larva recém eclodida e pós-larva, respectivamente) medido em dias após a fecundação

3.6 TAXA DE CRESCIMENTO PROTÉICO ESPECÍFICO

A concentração de proteínas totais foi determinada conforme descrito no item 3.4. O coeficiente de crescimento protéico (Gp) foi calculado através da equação, descrita por Caldarone e colaboradores (2001). A partir do cálculo do Gp foi calculada a Taxa de Crescimento Protéico Específico (SGR) (HOUDE e SCHEKTER, 1983).

$$SGR = (e^{Gp} - 1) \times 100 \quad (\% \cdot d^{-1})$$

$$\text{sendo, } Gp = \frac{\ln P_{t_2} - \ln P_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

onde:

SGR = taxa de crescimento protéico específico

P = concentração de proteínas nos organismos amostrados ($\mu\text{g}/\text{indivíduo}$)

t_1 e t_2 = tempo de desenvolvimento dos indivíduos (larva recém eclodida e pós-larva) medido em dias após a fecundação

3.7 MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

Foram utilizados indivíduos no estágio de pós-larvas (168 hpf, E29) fixadas em Paraformaldeído (PFA) 2% em PBS 0,1M, pH 7,3 por 30 minutos em temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$). Após a fixação, o material foi lavado duas vezes em PBS e estocado neste, sob refrigeração (4°C) até a continuidade do processamento.

As amostras foram desidratadas em série alcoólica crescente, diafanizadas em xilol, emblocadas em Paraplast Plus® e seccionadas transversalmente em micrótomo convencional ($7 \mu\text{m}$) (Anexo 3).

Foram analisados dois indivíduos por réplica, totalizando seis indivíduos por situação experimental. Cinco cortes de cada amostra foram afixados em lâminas contendo albumina de Meyer e corados com H.E. (hematoxilina/eosina) (conforme o protocolo do anexo 4).

A morfologia do tecido muscular das pós-larvas foi analisada através de microscópio de luz convencional. Com isso, lâminas com cortes correspondentes à mesma região corpórea (determinados com base na morfologia dos órgãos presentes na altura do tronco, como mostra a Fig. 8) foram selecionadas para se determinar a densidade das fibras em relação aos diferentes tratamentos, o que totalizou em média 62 cortes por situação experimental.

Através de uma câmera digital (Sony Cybershot® 13,2 MP) acoplado ao microscópio *Olympus* PM 10 AD, as imagens dos cortes selecionados foram digitalizadas para posterior análise.

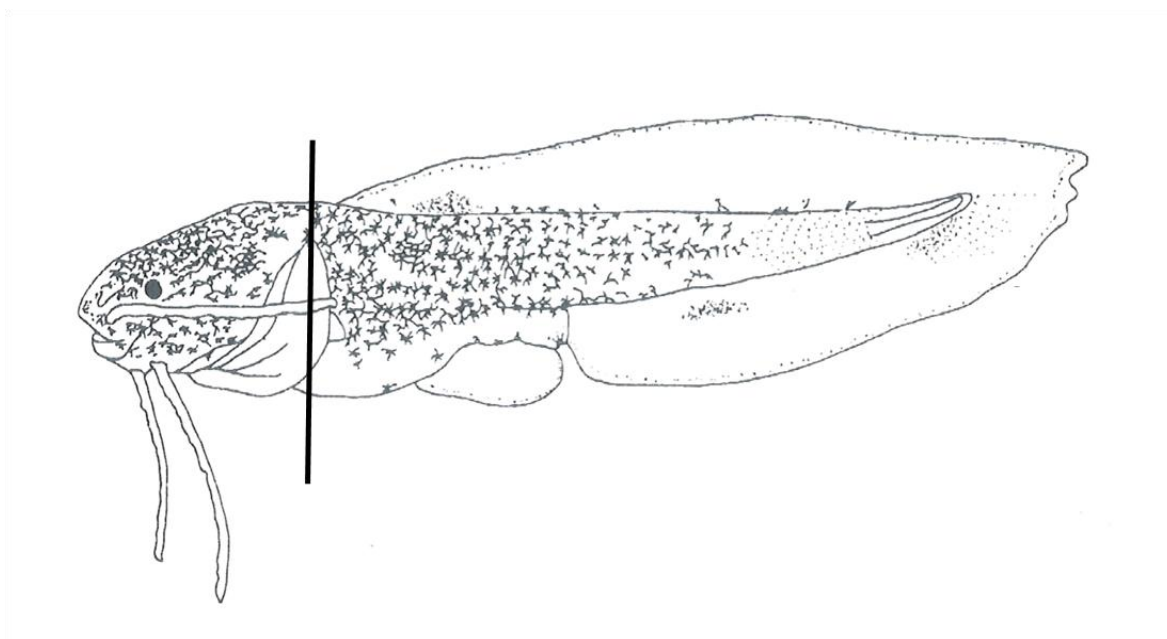


Figura 8 - Desenho esquemático de pós-larva de *R. quelen* mostrando a altura aproximada em que foram realizados os cortes a fim de estimar a densidade das fibras musculares esqueléticas em relação aos diferentes tratamentos de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L)

Pela técnica do duplo cego, as imagens foram devidamente enumeradas para posterior identificação dos tratamentos correspondentes. Utilizando o programa *Image J* (Wayne Rasband, National Institute of Mental Health, USA), foi medida a área total da região contendo tecido muscular estriado esquelético de cada corte. Manualmente, com o auxílio do programa *Photoshop* 7.0, foi realizada a quantificação do número total das fibras musculares na região onde foi medida a área em todas as imagens obtidas. A densidade de fibras musculares (fibras por mm^2) foi calculada com base no número de fibras presentes por área total de músculo.

3.8 ESTATÍSTICA

Os dados numéricos foram analisados através do software *GraphPad Prism* (5.01). Após a verificação de normalidade (teste Kolmogorov-Smirnov) foi aplicado o teste paramétrico ANOVA de duas vias (Análise de Variância) e, posteriormente, o pós-teste Tukey foi aplicado, nos casos em que houve diferença significativa entre os tratamentos pela análise de variância. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 TAXA DE SOBREVIVÊNCIA

No tratamento livre de cálcio (0 mg Ca^{2+} /L) houve baixa taxa de eclosão (não quantificada) em relação aos demais tratamentos analisados, de modo que os poucos indivíduos eclodidos não foram suficientes para análise da sobrevivência e crescimento em biomassa. Nas demais concentrações de cálcio (3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L) as pós-larvas apresentaram elevada taxa de sobrevivência (mais de 90%) até 168 hpf, aparentemente não havendo diferença entre os tratamentos, embora a análise estatística não tenha sido possível uma vez que as populações e não os indivíduos de cada réplica foram analisadas (Fig. 9).

Após incubação por 360 hpf, menos de 50% dos indivíduos sobreviveram em todas as concentrações de cálcio. Com isso, supõe-se que a maior taxa de sobrevivência (48%) foi obtida pelas pós-larvas incubadas com 18,18 mg/L de cálcio, seguida daquelas incubadas com 36,36 mg/L (42%), já a menor taxa de sobrevivência (35%) foi observada no grupo mantido em 3,63 mg/L de Ca^{2+} .

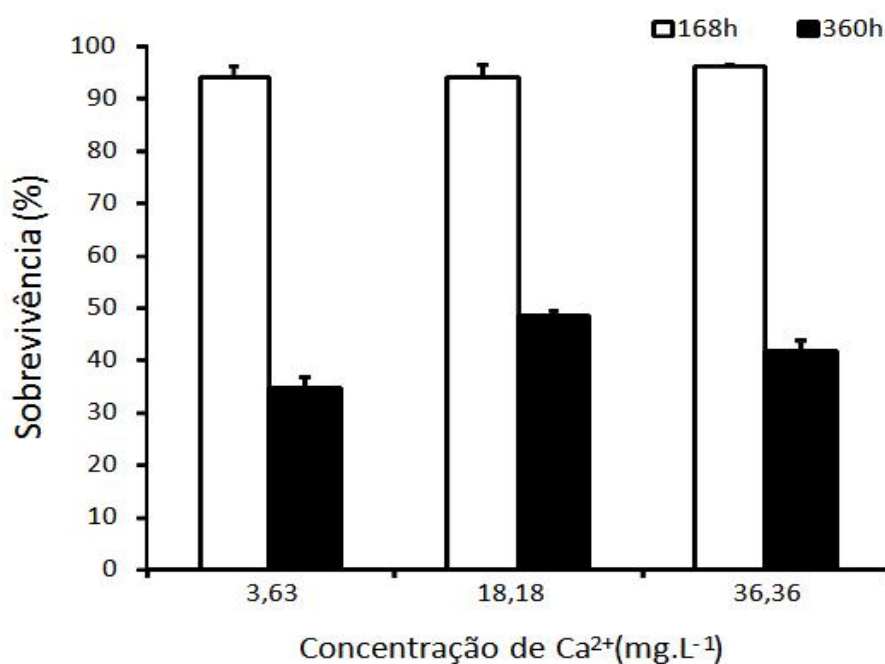


Figura 9 - Taxa de sobrevivência de pós-larvas de *Rhamdia quelen* com 168 e 360 hpf de incubação em diferentes concentrações de cálcio (3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L)

4.2 TAXA DE SÍNTESE PROTEÍCA (RAZÃO RNA/PROTEÍNA)

Nas larvas recém eclodidas, a incubação em diferentes níveis de Ca^{2+} não levou a alterações na concentração total de RNA ($p>0,05$), nem tampouco de proteínas ($p>0,05$), conforme representado nas Figs. 10 e 11. A razão RNA/proteínas também manteve-se estatisticamente constante ($p>0,05$) neste estágio, independente da concentração de Ca^{2+} (Fig.12).

Nas pós-larvas (168 hpf), o resultado foi semelhante aquele observado logo após a eclosão, embora verifique-se uma tendência ($p>0,05$) ao aumento da concentração de proteínas, bem como uma redução da razão RNA/Proteína nos tratamentos com Ca^{2+} quando comparados à incubação na ausência de Ca^{2+} . Ao se comparar as larvas eclodidas com as pós-larvas, verifica-se que a quantidade de RNA total é significativamente ($p<0,05$) maior nos organismos mais velhos (pós-larvas) em todas as concentração de Ca^{2+} .

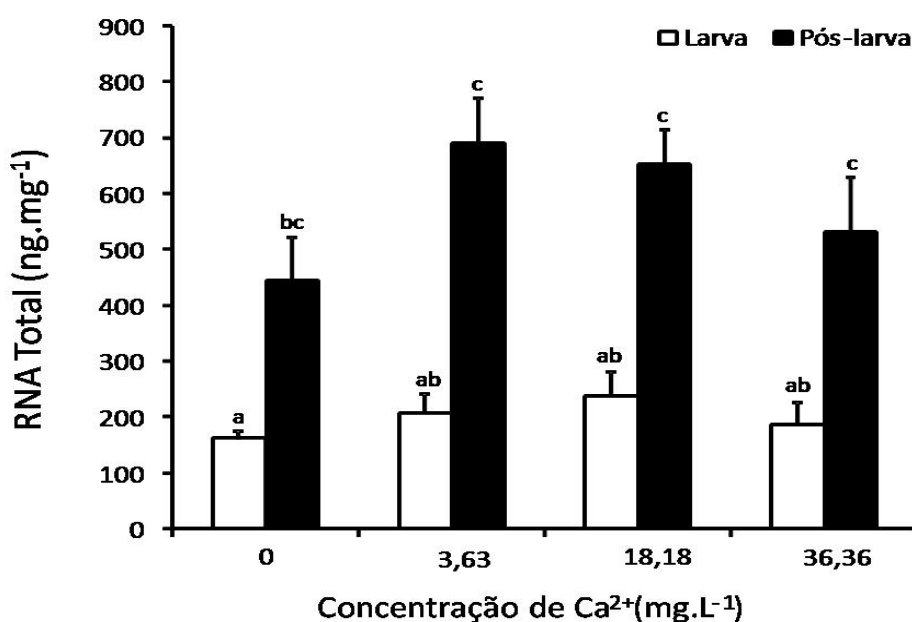


Figura 10 - RNA total de larvas e pós-larvas de *Rhamdia quelen* incubadas em diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L). Teste Tukey: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p<0,05$)

Nas pós-larvas, a concentração de cálcio na água não alterou significativamente a concentração total de RNA, nem tampouco de proteínas, conforme mencionado acima. Entretanto, verificou-se uma tendência à diminuição da razão RNA/proteínas à medida que a concentração de cálcio aumentou (Fig. 12),

sendo esta diferença significativa entre as duas concentrações extremas (0 e 36,36 mg/L).

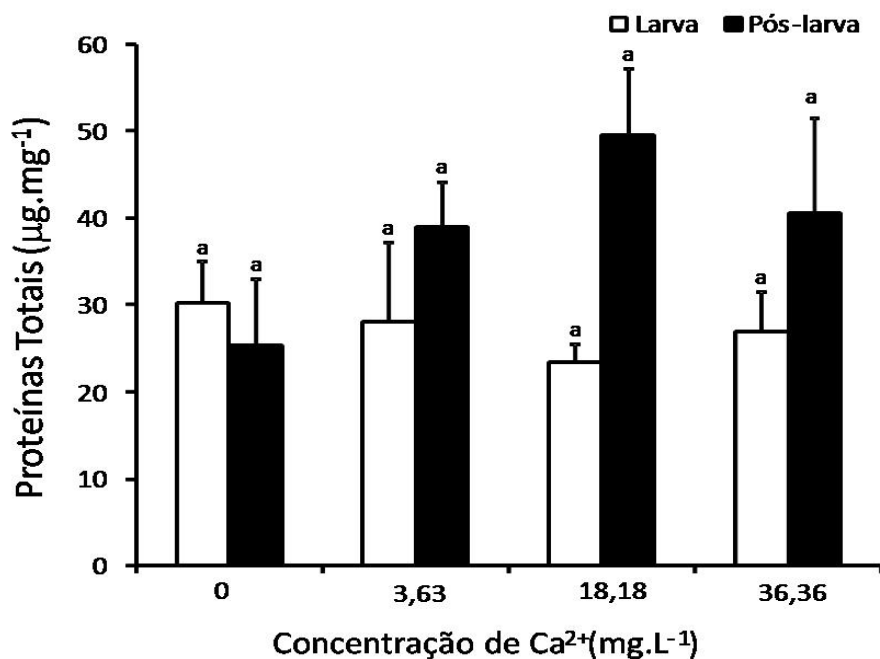


Figura 11 - Análise das proteínas totais de larva e pós-larva de *Rhamdia quelen* quando incubados em diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L). Teste Tukey: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (p<0,05)

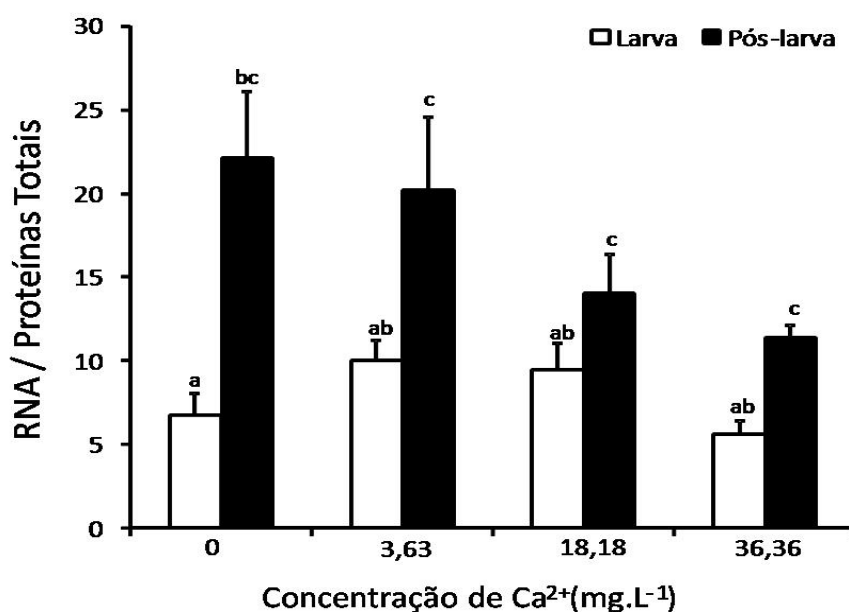


Figura 12 - Análise da razão RNA/Proteínas de larva e pós-larva de *Rhamdia quelen* quando incubados em diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L). Teste Tukey: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa (p<0,05)

4.3 MASSA CORPORAL E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO

Não foi possível a análise da massa corporal de larvas e pós-larvas incubadas na ausência de cálcio devido à intensa mortalidade ocorrida tanto antes quanto após a eclosão neste tratamento, não havendo desta forma indivíduos suficientes para esta análise.

Nas demais concentrações testadas, a massa corporal das larvas eclodidas foi semelhante ($p > 0,05$), independente dos níveis de cálcio na água. No entanto, houve uma tendência ao aumento da massa corporal das pós-larvas com o aumento dos níveis de cálcio, sendo significativo entre as concentrações extremas analisadas (Fig. 13). Conseqüentemente, o menor valor observado na massa corporal ocorreu no tratamento em que apresenta a menor concentração de Ca^{2+} (3,63 mg/L).

Já comparando os períodos de larva e pós larva, nota-se que houve uma tendência ($p > 0,05$) à perda de massa nas concentrações 3,63 e 18,18 mg/L e uma tendência ao aumento do peso em 36,36 mg/L. Contudo, essas diferenças não foram estatisticamente diferentes. Todavia a análise da taxa de crescimento relativo indica perda ($p < 0,05$) de massa das pós-larvas em relação às larvas nas concentrações 3,63 e 18,18 mg Ca^{2+} /L e um crescimento positivo na concentração mais alta (36,36 mg Ca^{2+} /L).

Os dados referentes à taxa de crescimento relativo entre larva e pós-larva (~24 e 168, respectivamente) mostraram que apenas na concentração 36,36 mg/L Ca^{2+} houve crescimento positivo das pós-larvas (168 hpf) em relação às larvas recém eclodidas (~24 hpf). Nas concentrações 0; 3,63 e 18,18 mg/L de Ca^{2+} , as pós-larvas (168 hpf) perderam peso em relação às larvas recém eclodidas (24 hpf) (Fig. 14).

Pode ser observado na Fig. 15 que existe uma correlação negativa ($y = 8,203 + 30,89$, $R^2 = 0,961$) entre a razão RNA/Proteína e a massa corporal. O que significa que quanto maior for a massa corporal do animal, menor será a razão RNA/Proteína, e maior a síntese protéica, pois, os baixos valores da razão RNA/Proteína indicam altos níveis de proteínas sendo traduzidas a partir do RNA disponível.

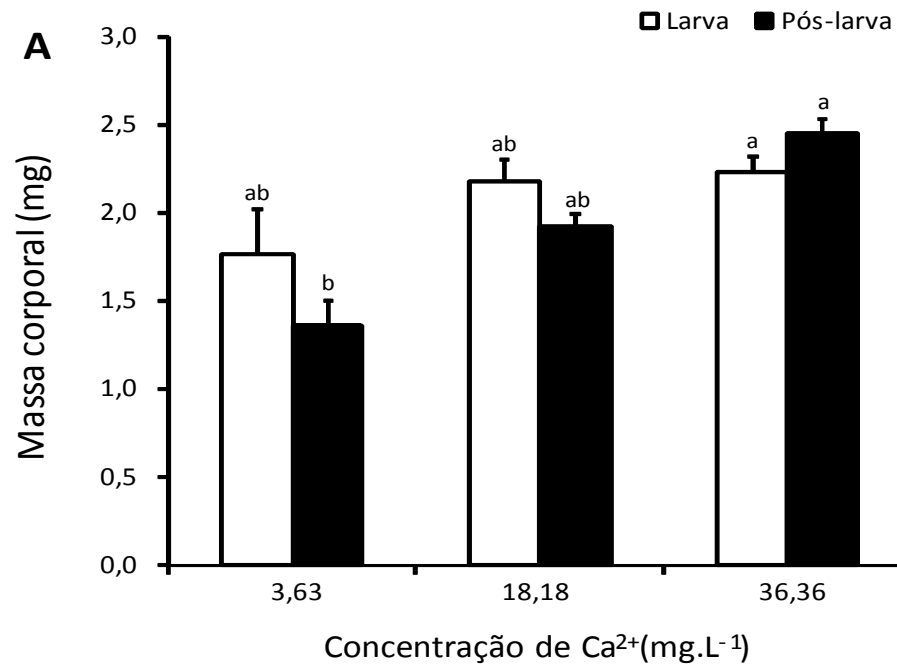


Figura 13 - Massa corporal (peso seco) de larvas (E25) e pós-larvas (E29) de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L). Teste Tukey: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$)

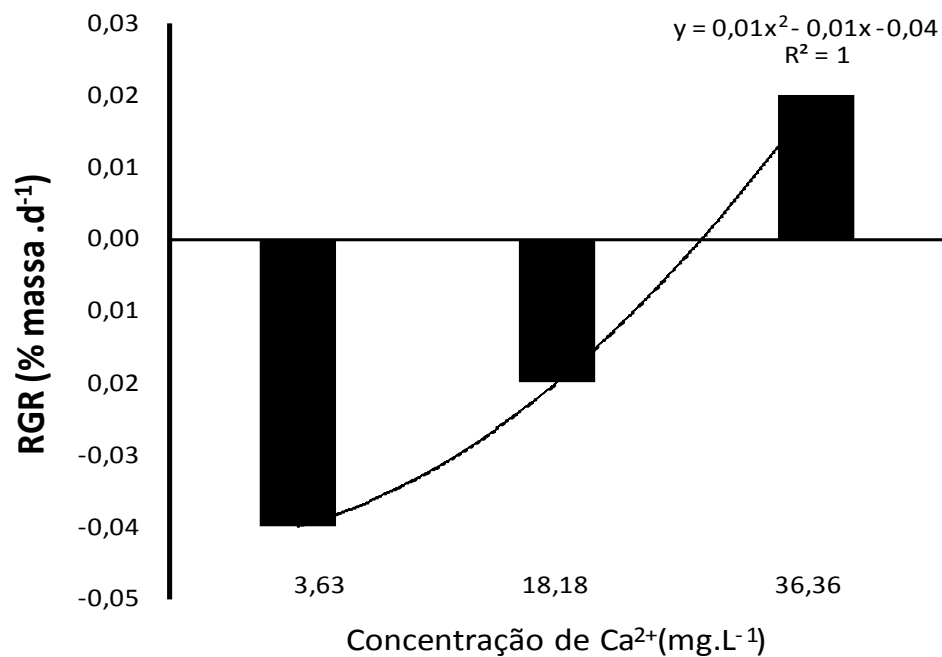


Figura 14 - Taxa de crescimento relativo (RGR) entre o período de eclosão (E25) e pós-larval (E29) de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L)

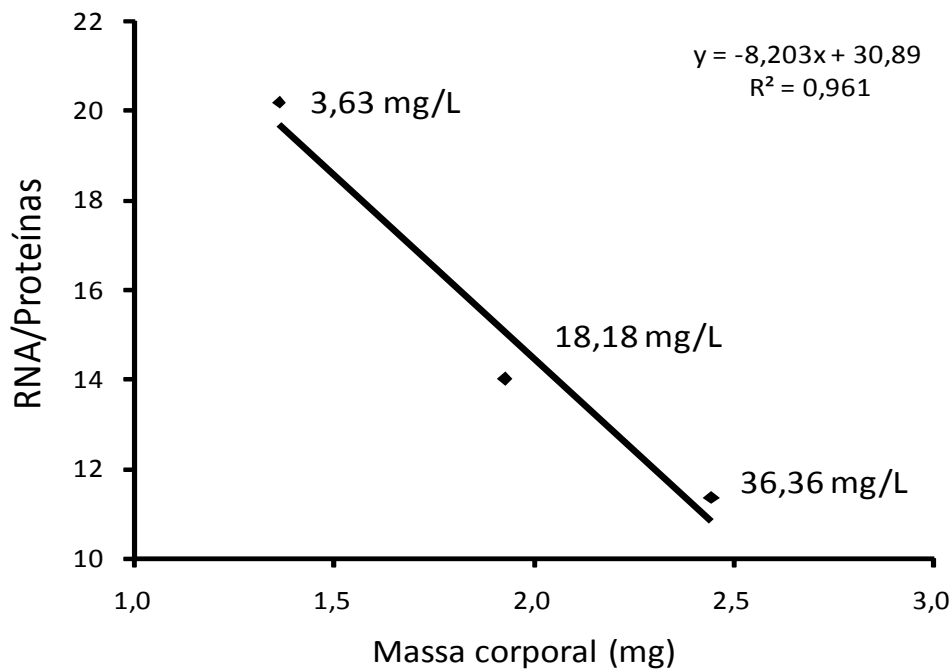


Figura 15 – Correlação entre RNA/Proteína e massa corporal de pós-larva de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L)

4.4 TAXA DE CRESCIMENTO PROTEÍCO ESPECÍFICO

Existe uma correlação positiva entre a taxa de crescimento protéico específico (SGR) e a concentração de cálcio (Fig. 16). Os dados mostraram que, no tratamento sem cálcio, as pós-larvas (168 hpf) perderam proteínas em relação às larvas recém eclodidas (24 hpf). No tratamento 3,63 mg/L de Ca²⁺, houve manutenção na concentração protéica das pós-larvas em relação ao período inicial analisado, resultando em SGR = 0% proteínas.d⁻¹. Já nos tratamentos 18,18 e 36,36 mg/L de Ca²⁺ houve crescimento específico positivo, o que pode ser verificado na Fig. 16.

Ao analisar a Fig. 17 pode ser notado que o SGR aumenta à medida que RGR, porém isso parece estacionar a partir de 18,18 mg Ca²⁺/L, não existindo uma correlação linear entre as duas taxas de crescimento (o SGR e o RGR). Entretanto, seriam necessários mais pontos (mais concentrações de Ca²⁺) para se confirmar essa tendência.

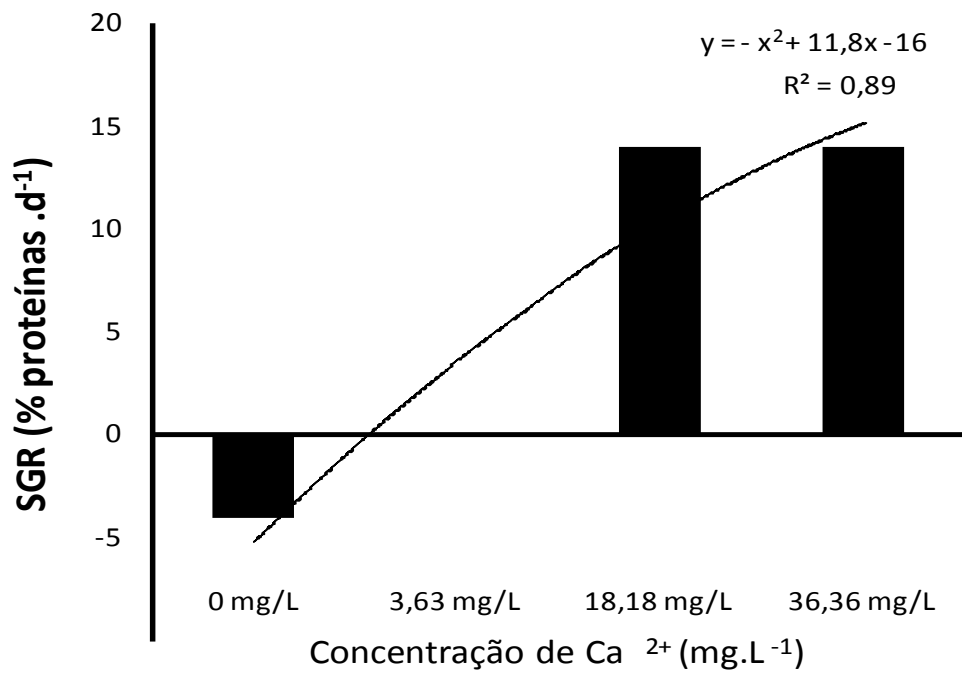


Figura 16 - Taxa de crescimento protéico específico (SGR) entre o período de eclosão (E25) e pós-larval (E29) de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L)

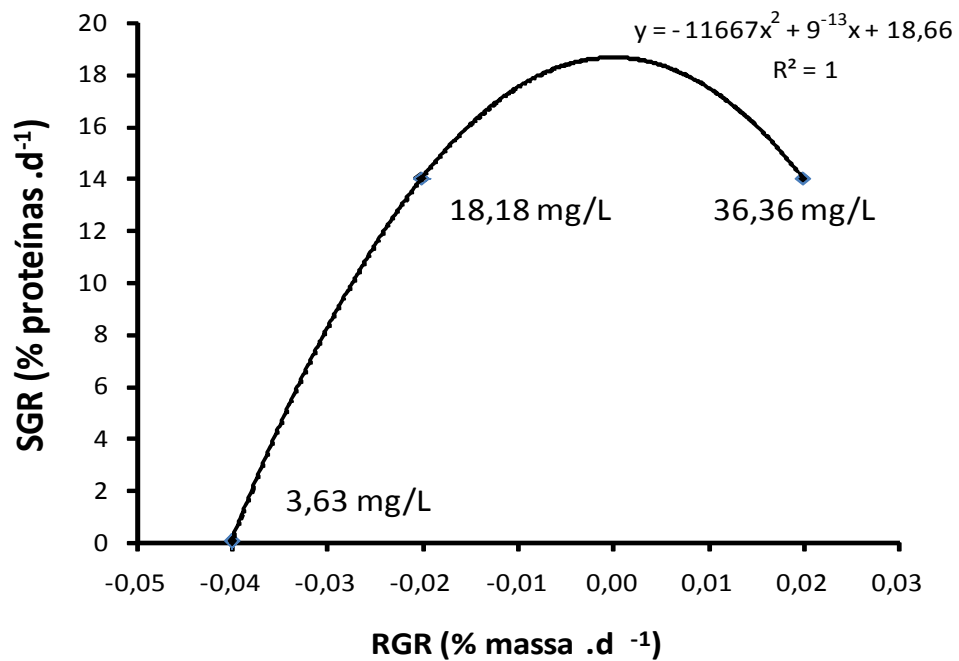


Figura 17 – Correlação entre SGR e RGR durante o desenvolvimento larval de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L)

4.5 MORFOMETRIA DAS FIBRAS MUSCULARES

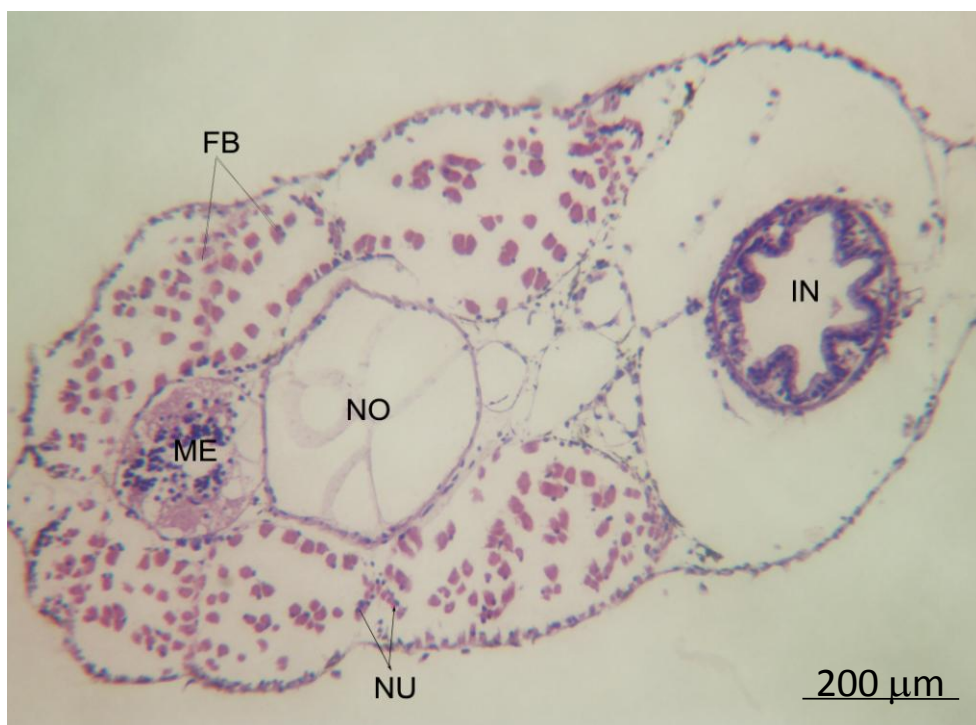


Figura 18 – Corte transversal de pós-larva (168 hpf) de *R. quelen* (coloração em H.E.) utilizado para estimar a densidade das fibras musculares (área demarcada em preto). ME) Medula espinhal. FB) Fibras musculares. IN) Intestino. NO) Notocorda. NU) Núcleo dos miócitos (fazer uma demarcação da área medida)

Dados estatísticos referentes ao número total de fibras musculares mostram que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de fibras em relação ao aumento na concentração de cálcio, em exceção ao tratamento 18,18 mg/L Ca^{2+} , cujo valor foi semelhante ao tratamento livre de Ca^{2+} (Tabela 7).

Já em relação à densidade das fibras, pode ser observado na Fig. 19 que houve um aumento significativo no número de fibras somente na concentração 36,36 mg/L Ca^{2+} quando comparado às demais concentrações testadas.

Verificou-se que existe uma correlação linear positiva entre a densidade de fibras musculares e massa corporal em função das diferentes concentrações de cálcio. Observa-se que os peixes com maior massa corporal também são aqueles que têm maior densidade das fibras, indicando que há relação positiva entre a massa corporal e densidade de fibras musculares (Fig. 20), apresentando desta forma relação positiva entre o ganho de proteínas (SGR), ganho de massa (RGR) e a densidade de fibras musculares, ou seja, houve crescimento muscular.

Tabela 7 – Número total das fibras musculares individuais das pós-larvas (168 hpf) de *R. quelen* submetidos a diferentes concentrações de Ca^{2+} . Os valores se referem à média do número de fibras referentes aos 62 cortes de cada indivíduo. A última linha da tabela mostra a média total para cada tratamento

Indivíduos	0 mg Ca^{2+} /L	3,63 mg Ca^{2+} /L	18,18 mg Ca^{2+} /L	36,36 mg Ca^{2+} /L
1	290 ± ,02 ^a	386 ± 52,36 ^b	267 ± 10,28 ^a	509 ± 40,85 ^c
2	331 ± 26,96 ^a	424 ± 21,22 ^b	302 ± 29,42 ^a	565 ± 27,93 ^c
3	326 ± 32,72 ^a	425 ± 19,30 ^b	402 ± 23,46 ^a	536 ± 13,25 ^c
4	309 ± 28,35 ^a	439 ± 27,12 ^b	390 ± 33,63 ^a	601 ± 63,09 ^c
5	361 ± 18,10 ^a	484 ± 24,72 ^b	395 ± 13,81 ^a	478 ± 14,41 ^c
6	371 ± 24,66 ^a	409 ± 15,62 ^b	379 ± 10,37 ^a	494 ± 19,46 ^c
Média	331 ± 30,62 ^a	428 ± 32,88 ^b	356 ± 56,85 ^a	531 ± 46,35 ^c

± indica o desvio padrão. Teste Tukey: letras diferentes ao lado dos valores indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) na comparação entre o número de fibras dos diferentes indivíduos. Na última linha da tabela, as letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os tratamentos

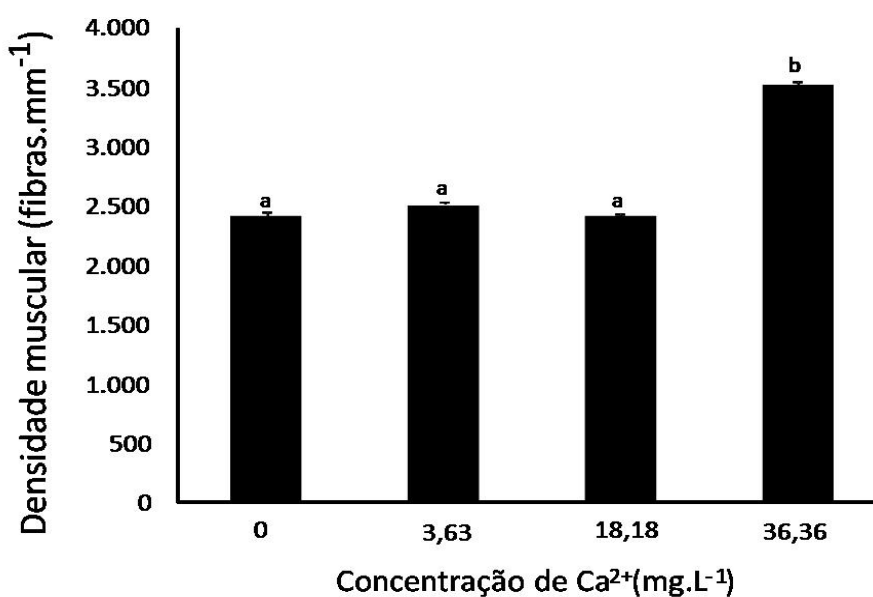


Figura 19 – Densidade das fibras musculares de pós-larvas de *R. quelen* quando incubadas em diferentes concentrações de cálcio na água (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L). Teste Tukey: letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

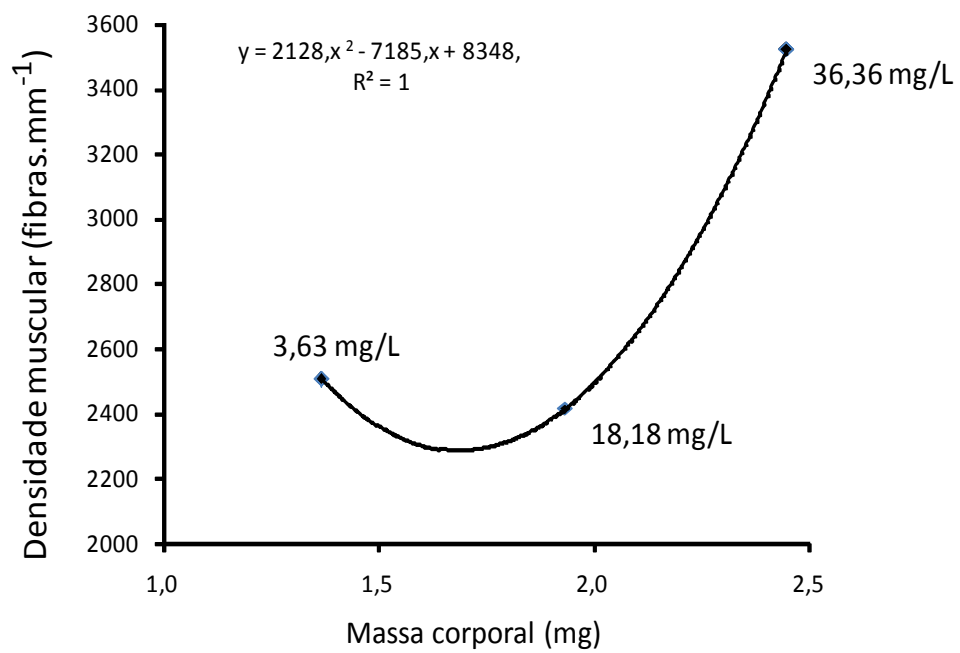


Figura 20 – Correlação entre a densidade muscular e a massa corporal de pós-larva de *Rhamdia quelen* submetidos a diferentes concentrações de cálcio (0; 3,63; 18,18 e 36,36 mg Ca²⁺/L).

5 DISCUSSÃO

O conhecimento sobre a dinâmica dos fatores físicos, químicos e biológicos que atuam no ambiente aquático é de grande importância para que se possa potencializar e aplicar aqueles que favoreçam o desenvolvimento dos peixes (TOWNSEND *et al.*, 2003). Na água doce o magnésio e, especialmente, o cálcio são os principais responsáveis pela dureza da água, sendo esta propriedade expressa em mg/L de CaCO_3 . Sabe-se que variações nestes íons interferem nos processos biológicos dos peixes (BALDISSEROTTO, 2002).

No Sul do Brasil, onde o jundiá (*Rhamdia quelen*) vem sendo amplamente cultivado, a dureza da água pode variar de 32 a 180 mg CaCO_3 /L, sendo recomendável para piscicultura valores acima de 20 mg/L CaCO_3 (GOLOMBIESKI *et al.*, 2005) (que equivale a 7,3 mg Ca^{2+} /L). Com base nestes dados, no presente estudo foram testadas concentrações de cálcio dissolvido na água acima e abaixo do nível mínimo recomendado, a saber, 0, 3,63, 18,18 e 36,36 Ca^{2+} /L (ou 0, 9, 45 e 91 mg CaCO_3 /L), que caracterizam águas moles a moderadamente duras.

Townsend e colaboradores (2003) estudaram o efeito da dureza (30 a 600 mg/L CaCO_3) no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de *R. quelen*, tendo submetido-as às condições experimentais apenas após a absorção total do vitelo, que ocorre cerca de 96 hpf (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009). Por outro lado, no presente estudo, os indivíduos desta espécie foram submetidos aos tratamentos desde o início do período embrionário (2 hpf), tendo permanecido por todo o período larval e parte do período pós-larval sob as condições experimentais.

Na ausência de cálcio, houve reduzida taxa de eclosão (dados não apresentados) e os poucos indivíduos eclodidos sobreviveram somente até a absorção do vitelo (cerca de 72 hpf). Deve-se lembrar que as condições de manutenção desses animais foram as mesmas dos demais grupos, incluindo a alimentação exógena *ad libitum*, não tendo sido essa, portanto, a causa da mortalidade.

Silva e colaboradores (2003) constataram que embriões de jundiá incubados em águas com níveis moderados de Ca^{2+} (70 mg CaCO_3 /L) apresentam taxa de eclosão mais elevada que sob concentrações mais baixas deste íon (20 mg CaCO_3 /L). Por outro lado, os mesmos autores verificaram que a incubação em água

dura (150 a 600 mg CaCO_3/L) resulta em diminuição na taxa de eclosão e sobrevivência pós-eclosão, quando comparados aos níveis mais baixos de CaCO_3 .

Os resultados obtidos tanto no presente estudo, quanto disponíveis na literatura (SILVA *et al.*, 2003), demonstram que o desenvolvimento embrionário (até a eclosão) é dependente de uma concentração de cálcio entre 9 e 90 mg CaCO_3/L (água mole a moderadamente dura). Fica claro que condições extremas, como a ausência absoluta ou a presença de cálcio em concentrações acima de 150 mg CaCO_3/L (água dura) interfere severamente nos processos biológicos dos embriões, impedindo a sua sobrevivência, sendo que níveis extremamente baixos de cálcio extracelular podem ser prejudiciais para as células (FRIDAY *et al.*, 2000).

Os resultados do presente trabalho mostram que o cálcio (dentre as concentrações avaliadas) não tem nenhum efeito aparente sobre larvas recém eclodidas para os parâmetros avaliados, indicando que foram pouco afetados no período embrionário que sucedeu à eclosão. Mais de 90% das larvas eclodidas sobreviveram até 168 hpf (7 dias) em todos os tratamentos. De modo semelhante, os efeitos aparentes da dureza da água no crescimento somente são observados após a absorção do saco vitelino, ou seja, no período pós-larval, tanto no jundiá (*R. quelen*) (SILVA *et al.*, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2003 quanto na tilápia (*Oreochromis mossambicus*) (HWANGL *et al.*, 1994). Todavia, foi demonstrado que larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) têm seu desenvolvimento prejudicado quando os níveis de cálcio na água estão abaixo de 6 mg Ca^{2+}/L (ROJAS *et al.*, 2004b).

Porém, mais de 90% dos indivíduos incubados nas três concentrações de cálcio sobreviveram até 7 dias (168 hpf), apresentando, no entanto, diferenças relativas ao crescimento. Analisando-se estas diferenças ontogenéticas e o efeito do cálcio, deve-se considerar que os peixes apresentam tendência à adaptabilidade ao efeito de diferentes níveis de cálcio dissolvido na água sobre sua fisiologia, respondendo lentamente as alterações do meio (FLIK e VERBOST, 1995). Com isso, os efeitos aparentes do cálcio no desenvolvimento dos peixes, podem ser constatados somente depois de um determinado período de exposição nesta condição (BALDISSEROTTO, 2002), apresentando desta forma repostas fisiológicas a longo prazo.

A mortalidade (50-65%) observada após 15 dias (360 hpf) em todos os tratamentos, não foi devido à concentração de cálcio na água, mas sim a outras condições laboratoriais de incubação, pois conforme afirma Townsend e

colaboradores (2003) as larvas de jundiá são extremamente frágeis e morrem principalmente nos primeiros dias após a soltura.

Foi constatado que a presença de cálcio dentro de certos limites, facilita osmorregulação, pois aumenta a concentração iônica do meio, amenizando o problema do equilíbrio osmótico que os peixes de água doce sofrem, reduz também a toxicidade de íons metálicos, H^+ , e amônia (TOWNSEND *et al.* 2003). Vários trabalhos relatam o efeito positivo da presença de cálcio na água, podendo diminuir o estresse de manuseio (TOWNSEND *et al.*, 2003) e ambiental, tornando as larvas mais resistentes (BALDISSEROTTO, 2002; BENADUCE *et al.*, 2008), embora não se saiba os mecanismos envolvidos neste processo. Foi verificado que a sobrevivência de pós-larvas de *R. quelen*, assim como outras espécies de peixes, tais como *Catostomus commersoni*, *Oncorhynchus mykiss*, *Perca flavescens* e *Salvelinus fontinalis*, é melhorada pela adição de Ca^{2+} em águas com pHs tanto ácidos quanto alcalinos (TOWNSEND e BALDISSEROTTO, 2001; COPATTI *et al.*, 2005). Por outro lado, concentrações muito altas de cálcio afetam negativamente a sobrevivência, biomassa e crescimento (TOWNSEND *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005).

As maiores taxas de sobrevivência apresentadas pelas pós-larvas de jundiá com 15 dias (360 hpf) foram aquelas observadas nos animais incubados nas concentrações mais elevadas de cálcio (18,18 e 36,36 mg Ca^{2+} /L) em relação às demais concentrações testadas. Estes níveis equivalem a 45 e 90 mg $CaCO_3$ /L, respectivamente, que se aproximam da melhor faixa de dureza determinada para a sobrevivência e crescimento das larvas de jundiá por vários autores (30-70 mg/L $CaCO_3$) (SILVA *et al.*, 2003; TOWNSEND *et al.*, 2003; ROJAS *et al.*, 2004c).

Townsend e colaboradores (2003) atribuíram a alta mortalidade ocorrida nas pós-larvas de jundiá incubadas em águas duras (150 a 600 mg $CaCO_3$ /L) ao estresse osmótico induzido pela presença de grande quantidade de íons na água. Há relatos que em *O. mossambicus* as primeiras células de cloreto aparecem na pele cerca de 48 hpf e nas brânquias em torno de 96 hpf (BALDISSEROTTO, 2002), o que, teoricamente, permitiria que as pós-larvas tivessem maior capacidade de regular os níveis internos de cálcio, evitando desta forma os efeitos tóxicos da alta concentração deste íon, porém dentro de um certo limite suportável.

Além disso, em situações de estresse, incluindo níveis ambientais de Ca^{2+} fora do limite de tolerância da espécie, ocorre aumento do cortisol plasmático. Esse

hormônio desempenha um papel importante na regulação de íons em peixes de água doce, mantendo o equilíbrio osmótico (FLIK e PERRY, 1989; WENDELAAR BONGA, 1997). No entanto, deve-se considerar que a presença de cortisol no sangue altera o metabolismo energético e o funcionamento do sistema imune, podendo resultar em alterações de crescimento, bem como na higidez do animal (JOBILING, 1994).

As baixas concentrações de cálcio afetaram não apenas a sobrevivência, conforme mencionado, como também o crescimento. Embora o peso das larvas (24 hpf) não tenha sido significativamente afetado pelo cálcio, as pós-larvas (168 hpf) submetidas a 3,63 mg Ca^{2+} /L apresentaram massa quase 50% inferior àquelas incubadas em 36,36 mg Ca^{2+} /L. Esses resultados corroboram os achados de outros estudos, que demonstraram que a baixa concentração de Ca^{2+} limita o crescimento dos peixes (COPATTI *et al.*; SILVA *et al.*, 2005), porém a longo prazo, provavelmente pelo grande estresse enfrentado neste período e nestas condições.

Comparando-se as larvas recém eclodidas (~24 hpf) com as pós-larvas com 7 dias (168 hpf), verificou-se uma perda de massa corporal da ordem de 22% nos indivíduos incubados em 3,63 mg Ca^{2+} /L e de cerca de 11,4% em 18,18 mg Ca^{2+} /L. Esta perda de massa explica a taxa de crescimento relativo (RGR) negativa apresentada por esses dois grupos. Por outro lado, as pós-larvas incubadas em água com nível mais elevado de cálcio (36,36 mg Ca^{2+} /L), ganharam cerca de 7,5 % de massa no período avaliado, apresentando, portanto, uma RGR positiva.

Deve-se lembrar que, no período considerado (até 168 hpf), as larvas de jundiá consomem suas reservas vitelínicas, que são completamente exauridas até cerca de 96 hpf (RODRIGUES-GALDINO *et al.*, 2009), havendo a transição da alimentação endógena para exógena nesta fase. Considerando que todos os grupos experimentais foram alimentados da mesma maneira, pode-se concluir que a energia contida no vitelo e/ou no alimento disponível não foi suficiente para promover o crescimento dos organismos incubados em concentrações de cálcio iguais ou inferiores a 18,18 mg Ca^{2+} /L. Deve-se levar em conta que, embora o alimento estivesse disponível para as pós-larvas, uma das respostas mais evidentes dos peixes em resposta à exposição a algum tipo de estressor ambiental é a cessação da alimentação (OBA *et al.*, 2009).

Para restabelecer o equilíbrio osmorregulatório, os peixes gastam energia extra, deprimindo o sistema imunológico, tornando-os mais suscetíveis a doenças

(CARNEIRO e URBINATI, 2001). Porém, o gasto energético para osmorregulação é considerado pequeno, não sendo capaz por si só de interferir nas exigências energéticas e, portanto, no crescimento dos peixes (JOBLING, 1994). Porém, a possível anorexia dos peixes, acompanhada dos efeitos catabólicos dos corticosteróides e também de catecolaminas sobre as reservas energéticas dos tecidos corporais, resulta num reduzido crescimento dos peixes estressados (OBA *et al.*, 2009).

Visto que o crescimento em peixes, como na maioria dos outros organismos, é realizado pela síntese de proteínas (BUCKLEY *et al.*, 1984; PELLETIER *et al.*, 1995; MOL *et al.*, 1999), fatores tanto bióticos quanto abióticos que afetem esse processo, podem ter consequências no crescimento (KATERSKY e CARTER, 2010).

Diversos estudos demonstraram que o cálcio está envolvido na estimulação de processos de degradação muscular, bem como na ativação e inibição de processos de síntese protéica (revisado por ZEMAN *et al.*, 1985). Isso sugere que se os níveis internos de cálcio não estiverem devidamente regulados, a síntese protéica e, conseqüentemente o processo de *turnover* muscular e o crescimento poderiam ser afetados. Porém, mesmo considerando que a regulação do fluxo de cálcio tenha sido eficiente, a variação ambiental deste íon pode ter sido geradora de estresse, desencadeando a liberação de cortisol e a anorexia, conforme discutido acima.

Deste modo, quando o peixe é exposto a agentes estressores, uma série de respostas é iniciada, sendo que, se o estresse é severo ou duradouro, os níveis mais altos da organização biológica tornam-se afetados (JOBLING, 1994). O estresse pode interferir de várias formas nos processos anabólicos e no sistema de regulação do crescimento, incluído a regulação hormonal. Na verdade, qualquer fator ambiental que afete o consumo de energia pode influenciar no crescimento dos peixes (GALLOWAY *et al.*, 1999), sendo que o cortisol exerce um efeito inibitório sobre a síntese protéica, bem como estimula a degradação de proteínas, refletindo em alterações no crescimento somático (HOULIHAN, 1995; OBA *et al.*, 2009). Por outro lado, as larvas de peixes respondem às condições favoráveis de crescimento, aumentando a síntese de proteína (BUCKLEY *et al.*, 1984).

O conteúdo de RNA total de uma célula é diretamente proporcional à taxa de síntese protéica (CLEMMESSEN, 1993; 1994; ROARK *et al.*, 2009) e ao crescimento de um animal (MATHERS *et al.*, 1992).

No presente estudo, a razão RNA/Proteínas, que é um indicador da capacidade de síntese protéica, não foi significativamente afetado pelo cálcio nas larvas. Contudo, as pós-larvas apresentaram razão RNA/Proteínas inversamente proporcional à concentração de cálcio, bem como à massa corporal. Uma elevada razão RNA/Proteínas indica uma baixa eficiência traducional e, portanto, uma reduzida síntese protéica (revisado por STORCH *et al.*, 2005).

Logo, os resultados indicam que, quanto maior a concentração de cálcio na água, maior síntese protéica. Isso é condizente com a maior massa corporal e a maior densidade de fibras musculares verificada no grupo de pós-larvas incubadas com a maior concentração de cálcio testada (36,36 mg Ca^{2+}/L) em relação aos demais grupos. Entretanto, comparando-se as pós-larvas mantidas em 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L , observa-se que embora não existem diferenças significativas na taxa de crescimento protéico específico (SGR), nem tampouco entre razão RNA/Proteínas dos dois grupos, a densidade de fibras musculares foi superior no grupo incubado com 36,36 mg Ca^{2+}/L . Analisando-se isso conjuntamente com a taxa de crescimento relativo (RGR), que foi positiva no grupo incubado com 36,36 mg Ca^{2+}/L e negativa no grupo incubado com 18,18 mg Ca^{2+}/L , pode-se concluir que embora a taxa de síntese protéica não tenha sido severamente afetada pela menor concentração de cálcio, o crescimento foi.

Deve-se considerar que foi determinada a concentração de proteínas totais e não necessariamente proteínas estruturais e/ou musculares. Isso sugere que, a regulação do processo de miogênese possa ter sido afetada, sem ter afetado a taxa de síntese protéica em si. Ou, ainda, que as necessidades energéticas sob essas condições (18,18 mg Ca^{2+}/L) foram maiores, resultando em degradação protéica, uma vez que se sabe que o catabolismo protéico é uma importante fonte de energia durante este período inicial do desenvolvimento (CALDARONE *et al.*, 2003).

A eficiência com que peixes e outros animais adicionam e mantêm as proteínas do corpo depende de um equilíbrio entre a síntese de proteínas e sua degradação. Para que ocorra o crescimento muscular pós-natal, deve haver um aumento na síntese protéica, consequentemente resultando em aumento da transcrição e de tradução (VELLEMAN, 2006). Em condições de perda de proteínas a taxa de degradação excede a de síntese, resultando obviamente em baixas taxas de crescimento (MOMMSEN, 2001), já que a maioria dos aminoácidos resultantes

da degradação de proteínas são utilizados no metabolismo energético (HOULIHAN, 1995).

É preciso considerar ainda que as larvas recém eclodidas têm muitas proteínas e RNAm provenientes da mãe (fatores maternos). À medida que o animal cresce, aumenta a produção de seus próprios RNAs e proteínas. Quando os fatores maternos se esgotam, a taxa de síntese protéica sofre uma queda, mas volta a se elevar novamente ao decorrer do desenvolvimento, devido ao início da transcrição e tradução dos genes zigóticos (GILBERT, 2010). Nas larvas recém eclodidas, a inalteração dos valores de RNA e proteínas indica que as concentrações de cálcio não afetaram a síntese protéica, o que é compatível com a semelhança entre a biomassa nos animais incubados nas diferentes concentrações de cálcio.

Na concentração de 3,36 mg/L, ao se comparar larvas com pós-larvas, a perda de massa indicada pelo RGR deve refletir o consumo das reservas vitelínicas. Porém a manutenção do SGR indica que houve síntese protéica, no entanto o crescimento não foi suficiente para que houvesse um ganho real de peso. A energia proveniente do vitelo deve ter sido usada em outros processos, possivelmente envolvidos com regulação iônica e com respostas ao estresse.

Já na concentração de 18,18 mg/L, os resultados foram parcialmente semelhantes àqueles observados nos animais incubados com 3,63 mg/L. As pós-larva aumentaram as concentrações de RNA, embora tenham mantido as concentrações de proteínas observadas nas larvas. Isso resultou em uma razão RNA/Proteína semelhante nas larvas e pós larvas mantidas nos mesmos níveis de cálcio, porém menores que nas concentrações mais baixas do íon. Isso sugere uma maior eficiência na síntese protéica desses animais, o que pode ser comprovado pela SGR positiva. No entanto, a redução no RGR indica que o crescimento não foi suficiente para compensar a perda gerada pelo consumo das reservas vitelínicas.

O crescimento corporal dos peixes está fortemente relacionado ao crescimento muscular, uma vez que este tecido adulto pode representar mais da metade da massa corporal (SANTOS, 2007; SILVA *et al.*, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2010). Em larvas recém-eclodidas de carpa comum *Cyprinus carpio*, o músculo do tronco (branco e vermelho) representam apenas cerca de 20% do volume corporal, mas esta proporção vai aumentando à medida que o peixe cresce (ALAMI-DURANTE *et al.*, 1997).

A quantidade de massa muscular é uma característica de extrema importância para a sobrevivência dos peixes (SHIERHOLT *et al.*, 2008), sendo que as condições ambientais, tais como variações na composição da água, podem afetar diretamente o mecanismo de crescimento muscular (JOHNSTON *et al.*, 1998; JOHNSTON, 2006), particularmente em peixes quando comparados aos mamíferos e às aves (KOUMANS e AKSTER, 1995).

O processo de desenvolvimento das fibras musculares está quase completo no momento da eclosão (VELLEMAN, 2006) e o número de fibras aumenta rapidamente no início do desenvolvimento larval, diminuindo posteriormente devido à fusão das fibras (hipertrofia) até se estabilizar (STICKLAND, 1983). Devido a estes motivos, as pós-larvas oferecem características ideais para análise do crescimento muscular.

O maior e melhor resultado encontrado foi o efeito positivo do cálcio na miogênese, com valores significativamente maiores de densidade de fibras musculares na concentração mais elevada de cálcio (36,36 mg Ca^{2+}/L). Neste tratamento, avaliando-se a relação massa corporal e a celularidade, verificou-se que os peixes com maior massa corporal apresentam também a maior densidade das fibras, indicando que houve um crescimento hiperplásico nesses animais. O fato destas pós-larvas possuírem maior número de fibras musculares assegura que elas gerem adultos com tamanhos mais elevados do que aqueles de ambientes mais pobres em Ca^{2+} . Este fato garante uma grande vantagem ecológica para os peixes, bem como econômico para o setor produtivo.

Com base no conjunto dos dados obtidos, é possível concluir que na concentração mais elevada de cálcio estudada (36,36 mg Ca^{2+}/L), as pós-larvas de *R. quelen* apresentaram crescimento muscular hiperplásico significativo, uma vez que nessa concentração as pós-larvas apresentaram diferenças estatísticas positivas em ganho de massa corporal, síntese e crescimento protéico e elevada densidade muscular, quando comparadas com os demais tratamentos (0; 3,63 e 18,18 mg Ca^{2+}/L). Nesse caso, esses aspectos é um indicativo de que o crescimento hiperplásico está ativo nesta fase, sendo, mais intenso que o hipertrófico (ALMEIDA *et al.*, 2010).

É sabido que, além dos fatores ambientais, o tamanho final da espécie deve ser considerado ao se avaliar o crescimento muscular (AGUIAR, 2005). Porém os fatos aqui relatados evidenciam que os fatores ambientais realmente interferem no

crescimento muscular, como afirmado em outros estudos (VELLEMAN, 2006; FERNÁNDEZ e CALVO, 2009), podendo-se concluir que o cálcio dissolvido na água tem efeito positivo sobre a miogênese entre períodos larval e pós-larval.

Sabe-se que o cálcio é um importante regulador da fisiologia do músculo esquelético (HORSLEY *et al.*, 2001). Dados da literatura demonstram que, na presença de níveis adequados de cálcio, a calcineurina induz as células do músculo esquelético a iniciar a diferenciação hipertrófica *in vitro* e *in vivo* (DUNN *et al.*, 1999; FRIDAY *et al.*, 2000; HORSLEY *et al.*, 2001). Assim, seriam interessantes estudos do efeito do cálcio em períodos posteriores do desenvolvimento, para se verificar os resultados sobre a fase hipertrófica do crescimento, avaliando mais precisamente a contribuição do cálcio no tamanho dos peixes adultos, visto que em peixes mais velhos que os aqui estudados o crescimento muscular hiperplásico possivelmente supera o hipertrófico. A hiperplasia é a fase de crescimento mais intenso em peixes de rápido crescimento e grande porte (ALMEIDA *et al.*, 2008),

Dado o exposto, pode constatar que a concentração de cálcio dissolvido na água afeta a sobrevivência de embriões e larvas, bem como o crescimento, a síntese protéica e a densidade das fibras musculares no período pós-larval de *R. quelen*. De fato, esses dados confirmam o que diz na literatura, sobre a forte plasticidade pelos peixes apresentada em relação às variações ambientais (JOHNSTON, 1999; KOUMANS e AKSTER, 1995) e dentre estas, especificamente pelo cálcio, como visto nesse estudo.

Em virtude dos fatos mencionados e dos resultados obtidos, a concentração de cálcio na água dentro de determinados limites pode ser satisfatória no cultivo de peixes para fins comerciais. No presente estudo, a maior concentração analisada (36,36 mg Ca^{2+} /L) foi considerada mais vantajosa em relação à demais. Uma vez que esta concentração equivale à dureza de 91 mg CaCO_3 /L, agregando os presentes dados com os da literatura (TOWNSEND *et al.*, 2003), poder-se-ia afirmar que a faixa de dureza entre 30 e 90 mg CaCO_3 /L é a mais apropriada para o cultivo do jundiá.

6 CONCLUSÕES

Considerando as condições em que foram realizados os presentes experimentos, é possível concluir que:

- 1) A ausência de cálcio dissolvido na água afeta negativamente a sobrevivência de embriões e larvas de *Rhamdia quelen*.
- 2) Quando incubadas nas concentrações de cálcio 3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L pós-larvas de *Rhamdia quelen* apresentam taxa de sobrevivência semelhante (maior que 90%) até o período de 7 dias (168 hpf¹) e entre 35 e 48% até o período de 15 dias (360 hpf), não sendo portanto, a mortalidade atribuída ao cálcio.
- 3) A massa corporal das pós-larvas com 7 dias (168 hpf) apresentou uma correlação positiva com a concentração de cálcio dissolvido na água (3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L), porém não foi alterada em larvas recém eclodidas de *Rhamdia quelen*.
- 4) As concentrações de cálcio testadas (0, 3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L) não alteraram concentração total de RNA e de proteínas, tanto em larvas, quanto em pós-larvas com 7 dias (168 hpf) de *Rhamdia quelen*. 5) A razão RNA/Proteínas das pós-larvas com 7 dias (168 hpf) foi inversamente proporcional à concentração de cálcio (0, 3,63, 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L), bem como à massa corporal, indicando que quanto maior a concentração de cálcio, maior a síntese protéica e maior a massa corporal, porém esses parâmetros não foram alterados em larvas recém eclodidas de *Rhamdia quelen*.
- 6) Entre o período larval (~24h) e pós-larval (168 hpf), houve perda de massa corporal nos indivíduos de *Rhamdia quelen* incubados em 3,63 e 18,18 mg Ca^{2+}/L e ganho de massa na concentração 36,36 mg Ca^{2+}/L .
- 7) Entre o período larval (~24h) e pós-larval (168 hpf), houve perda de massa protéica nos indivíduos incubados em 0 mg Ca^{2+}/L , manutenção do conteúdo

¹ horas após a fecundação

protéico em 3,63 mg Ca^{2+}/L e acúmulo de proteínas nas concentrações 18,18 e 36,36 mg Ca^{2+}/L .

8) A densidade de fibras musculares das pós larvas com 7 dias (168 hpf) incubadas na concentração 36,36 mg Ca^{2+}/L foi maior que naqueles incubados nas demais concentrações (3,63 e 18,18 mg Ca^{2+}/L).

9) Foi observado maior massa corporal e maior densidade de fibras musculares nos indivíduos incubados em 36,36 mg Ca^{2+}/L , indicando que houve crescimento hiperplásico.

10) A melhor concentração de Ca^{2+} para a sobrevivência, crescimento e miogênese de *R. quelen* é 36,36 mg Ca^{2+}/L , o que mostra a relevância do cálcio no desenvolvimento e miogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBINK, W.; BEVELANDER, G.S.; ROTLLANT, J.; CANARIO, A. V.M.; FLIK, G. Calcium handling in *Sparus auratus*: effects of water and dietary calcium levels on mineral composition, cortisol and PTHrP levels. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.4077-4084, 2004.
- AGUIAR, D.H.; BARROS, M.M.; PADOVANI, C.R.; PEZZATO, L.E.; DAL PAI-SILVA, M. Growth characteristics of skeletal muscle tissue in *Oreochromis niloticus* larvae fed on a lysine supplemented diet. **Journal of Fish Biology**, v.67, p.1287-1298, 2005.
- AKAISHI, F.M. **Aplicação de biomarcadores de contaminação ambiental em estudos de laboratório e monitoramento em campo**. 2003. 112f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ALAMI-DURANTE, H.; FAUCONNEAU, B.; ROUEL, M.; ESCAFFRE, A.M.; BERGOT, P. Growth and multiplication of white skeletal muscle fibres in carp larvae in relation to somatic growth rate. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p.1285-1302, 1997.
- ALLEN, J.P.; WEBB, M.A.H.; CURETON, E.; BRUCH, R.M.; BARTH, C.C.; PEAKE, S.J.P.; ANDERSON, W.G. Calcium regulation in wild populations of a freshwater cartilaginous fish, the lake sturgeon *Acipenser fulvescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.154, p. 437-450, 2009.
- ALMEIDA, F.L.A.; CARVALHO, R.F.; PINHAL, D.; PADOVANI, C.R.; MARTINS, C.; DAL PAI-SILVA, M. Differential expression of myogenic regulatory factor MyoD in pacu skeletal muscle (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887: Serrasalminae, Characidae, Teleostei) during juvenile and adult growth phases. **Micron**, v.39, p.1306-1311, 2008.
- ALMEIDA, F.L.A.; PESSOTTI, N.S.P.; PINHAL, D.; PADOVANI, C.R.; LEITÃO, N.J.; CARVALHO, R.F.; MARTINS, C.; PORTELLA, M.C.; DAL PAI-SILVA, M. Quantitative expression of myogenic regulatory factors MyoD and myogenin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) skeletal muscle during growth. **Micron**, v.41, p.997-1004, 2010.
- AMTHOR, H.; CHRIST, B.; PATEL, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth: a balance between proliferation and differentiation. **Development**, v.126, p.1041-1053, 1999.
- ASSIS, J.M.F.; CARVALHO, R.F.; BARBOSA, L.; AGOSTINHO, C.A.; DAL PAI-SILVA, M. Effects of incubation temperature on muscle morphology and growth in the pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Aquaculture**, v. 237, p.251-267, 2004.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002.

BALDISSEROTTO, B; RADÜNZ NETO, J. **Criação de jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; COPATTI, C.E.; GOMES, L.C.; CHAGAS, E.C.; BRINN, R.P.; ROUBACH, R. Calcium fluxes in *Hoplosternum littorale* (tamoatá) exposed to different types of amazonian waters. **Neotropical Ichthyology**, v.7, n.3, p.465-470, 2009.

BENADUCE, A.P.S.; KOCHHANN, D.; FLORES, E.M.M.; DRESSLER, V.L.; BALDISSEROTTO, B. Toxicity of cadmium for silver catfish *Rhamdia quelen* (Heptapteridae) embryos and larvae at different alkalinities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.54, p. 274-282, 2008.

BOOTMAN, M.D.; COLLINS, T.J.; PEPPIATT, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEY, S.C.; SEO, J.T.; BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.C.; LIPP, P. Calcium signaling - an overview. **Seminars in cell & developmental Biology**, v.12, p.3-10, 2001.

BUCKLEY, L.J. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. **Marine Biology**, v.80, p.291-298, 1984.

BUCKLEY, J.; TURNER, S.I.; HALAVIK, T.A.; SMIGIELSKI, A.S.; DREW, S.M.; LAURENCE, G.C. Effects of temperature and food availability on growth, survival, and RNA-DNA ratio of larval sand lance (*Ammodytes americanus*). **Marine Ecology**, v.15, p.91-97, 1984.

CALDARONE, E.M.; ONGE-BURNS, J.M.S.; BUCKLEY, L.J. Relationship of RNA/DNA ratio and temperature to growth in larvae of Atlantic cod *Gadus morhua*. **Marine Ecology**, v.262, p.229-240, 2003.

CAO, Y.; YAO, Z.; SARKAR, D.; LAWRENCE, M.; SANCHEZ, G.J.; PARKER, M.H.; MACQUARRIE, K.L.; DAVISON, J.; MORGAN, M.T.; RUZZO, W.L.; GENTLEMAN, R.C.; TAPSCOTT, S.J. Genome-wide MyoD binding in skeletal muscle cells: a potential for broad cellular reprogramming. **Developmental Cell**, v.18, p.662-674, 2010.

CARNEIRO, P.C.F.; URBINATI, E.C. Salt as a stress response mitigator of matrix in *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae) during transport. **Aquaculture Research**, v.32, p.297-304, 2001.

CLEMMESSEN, C. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. **Marine Ecology**, v.100, p.177-183, 1993.

CLEMMESSEN, C. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae: laboratory calibration. **Marine Biology**, v.118, p.377-382, 1994.

- COPATTI, C.E.; COLDEBELLA, I.J.; RADUNZ NETO, J.; GARCIA, L.O.; ROCHA, M.C.; BALDISSEROTTO, B. Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH. **Aquaculture Nutrition**, v.11, p.345-350, 2005.
- COSSU, G.; BORELLO, U. Wnt signaling and the activation of myogenesis in mammals. **European Molecular Biology Organization journal**, v.18, n.24, p.6867-6872, 1999.
- CRÉTON, R.; SPEKSNIJDER, J.E.; JAFFE, L.F. Patterns of free calcium in zebrafish embryos. **The Netherlands Journal of Cell Science**, v.111, p.1613-1622, 1998.
- DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F.; PELLIZZON, C.H.; DAL PAI, V. Muscle growth in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): histochemical, ultrastructural and morphometric study. **Tissue & Cell**, v.35, p.179-187, 2003.
- DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, *suplemento especial*, p.21-31, 2007.
- DUNN, S.E.; BURNS, J.L.; MICHEL, R.N. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. **The Journal of Biological Chemistry**, v.274, n.31, p. 21908-21912, 1999.
- EBERT, A.M.; MCANELLY, C.A.; SRINIVASAN, A.; MUELLER, R.L.; GARRITY, D.B.; GARRITY, D.M. The calcium channel $\beta 2$ (CACNB2) subunit repertoire in teleosts. **Biomed Central Molecular Biology**, v.9, n.38, 2008.
- FERNÁNDEZ, D.A.; CALVO, J. Fish muscle: the exceptional case of notothenioids. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.43-52, 2009.
- FLIK, G.; PERRY, S.F. Cortisol stimulates whole body calcium uptake and the branchial calcium pump in freshwater rainbow trout. **Journal of Endocrinology**, v.120, p.75-82, 1989.
- FLIK, G.; VERBOST, P.M. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fishes. **Biochemistry and Molecular Biology and Fishes**, v.5, p.252-263, 1995.
- FLUCK, R.A.; MILLER, A.L.; JAFFE, L.F. Slow calcium waves accompany cytokinesis in medaka fish eggs. **The Journal of Cell Biology**, v.115, n.5, 1259-1265, 1991.
- FONTAGNÉ, S.; SILVA, N.; BAZIN, D.; RAMOS, A.; AGUIRRE, P.; SURGET, A.; ABRANTES, A.; KAUSHIK, S.J.; POWER, D.M. Effects of dietary phosphorus and calcium level on growth and skeletal development in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. **Aquaculture**, v.297, p.141-150, 2009.

- FRIDAY, B.B.; HORSLEY, V.; PAVLATH, G.K. Calcineurin activity is required for the initiation of skeletal muscle differentiation. **The Journal of Cell Biology**, v.149, n.3, p.657-665, 2000.
- FRIDAY, B.B.; PAVLATH, G.K. A calcineurin- and NFAT-dependent pathway regulates Myf5 gene expression in skeletal muscle reserve cells. **Journal of Cell Science**, v.114, p.303-310, 2001.
- GALLOWAY, T.F.; KJORSVIK, E.; KRYVI, H. Muscle growth and development in atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) related to different somatic growth rates. **The Journal of Experimental Biology**, v.202, p.2111-2120, 1999.
- GILBERT, S.F. **Developmental biology**. 8.ed. Sunderland: Sinauer, 2006.
- GILBERT, S.F. **Developmental Biology**. 9.ed. Sunderland: Sinauer, 2010.
- GOLOMBIESKI, J.I.; MARCHEZAN, E.; MONTI, M.B.; STORCK, L.; CAMARGO, E.R.; SANTOS, F.M. Qualidade da água no consórcio de peixes com arroz irrigado. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1263-1268, 2005.
- GRAEFF, A.; TOMAZONI, A.F.; PRUNER, E.N.; MARAFON, A.T. Influência da dureza e do pH no desenvolvimento do jundiá (*Rhamdia Quelen*) na fase de fertilização até a produção de pós-larvas. **Revista Electrónica de Veterinaria**, v.8, n.9, p.1-7, 2007.
- HORSLEY, V.; FRIDAY, B.B.; MATTESON, M.; KEGLEY, K.M.; GEPHART, J.; PAVLATH, G.K. Regulation of the growth of multinucleated muscle cells by an NFATC2-dependent pathway. **The Journal of Cell Biology**, v.153, n.2, p.329-338, 2001.
- HOUDE, E.D.; SCHEKTER, R.C. Oxygen Uptake and Comparative Energetics Among Eggs and Larvae of Three Subtropical Marine Fishes. **Marine Biology**, v.72, p.283-293, 1983.
- HOULIHAN, D.F. Protein turnover in ectotherms and its relationship to energetics. **Advances in Comparative and Environmental Physiology**, v.7, p.1-43, 1991.
- HOULIHAN, D.F.; MATHERS, E.; FOSTER, A. R. Biochemical correlates of growth rate in fish. In: Jensen, J.C., Rankin, F.B. (Eds.), **Fish Ecophysiology**. Chapman & Hall, London, p.45-71, 1993.
- HOULIHAN, D.F.; CARTER, C.G.; MCCARTHY, I. D. Protein synthesis in fish *Hochachka and Mommsen (eds.)*. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v.4, chapter 8, p.191-220, 1995.
- HUXLEY, H.E. The mechanism of muscular contraction. **Science**, v.164, p.1356–1366, 1969.

HWANGL, P.P.; TSAIL, Y.N.; TUNG, Y.C. Calcium balance in embryos and larvae of the freshwater-adapted teleost, *Oreochromis mossambicus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.13, n.4, p. 325-333, 1994.

JIMENEZ, A.G.; SANTOS, H.K.; DASIKA, S.K.; LOCKE, B.R.; KINSEY, S.T. An evaluation of muscle maintenance costs during fiber hypertrophy in the lobster *Homarus americanus*: are larger muscle fibers cheaper to maintain? **The Journal of Experimental Biology**, v.214, p.3688-3697, 2011.

JOBLING, M. **Fish Bioenergetics**. London: Chapman & Hall, 1994.

JOHNSTON, I.A. Physiology of muscle in hatchery raised fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v.7, n.1, p.10-124, 1982.

JOHNSTON, I.A.; COLE, N.J.; ABERCROMBY, M.; VIEIRA, V.L.A. Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.623-646, 1998.

JOHNSTON, I.A. Muscle development and growth: potential implications for flesh quality in fish. **Aquaculture**, v.177, p.99-115, 1999.

JOHNSTON, I.A.; ALDERSON, R.; SANDHAM, C.; MITCHELL, M.; SELKIRK, C.; DINGWALL, A.; NICKELL, D.; BAKER, R.; ROBERTSON, B.; WHYTE, D.; SPRINGATE, J. Patterns of muscle growth in early and late maturing populations of Atlantic salmon *Salmo salar*. **Aquaculture**, v.189, p.307-333, 2000.

JOHNSTON, I.A. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.2249-2264, 2006.

JOHNSTON, I.A.; MACQUEEN, D.J.; WATABE, S. Molecular biotechnology of development and growth in fish muscle. **Fisheries for Global Welfare and Environment**, 5th World Fisheries Congress, p. 241-262, 2008.

KATERSKY, R.S.; CARTER, C.G. The effect of temperature on post-prandial protein synthesis in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v.156, p.529-536, 2010.

KEGLEY, K.M.; GEPHART, J.; WARREN, G.L.; PAVLATH, G.K. Altered primary myogenesis in NFATC3 mice leads to decreased muscle size in the adult. **Developmental Biology**, v.232, p.115-126, 2001.

KIMMEL, C.B.; BALLARD, W.W.; KIMMEL, S.R.; ULLMANN, B.; SCHILLING, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. **Developmental Dynamics**, v.203, p.253-310, 1995.

KOUMANS, J.T.M.; AKSTER, H.A. Myogenic cells in development and growth of fish. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**. v.110, n.1, p.3-20, 1995.

MATHERS, E.M.; HOULIHAN, D.E.; CUNNINGHAM, M.J. Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish. **Marine Biology**, v.112, p.363-369, 1992.

MOL, J.H.; ATSMAN, W.; FLIK, G.; BOUWMEESTER, H.; OSSE, J.W.M. Effect of low ambient mineral concentrations on the accumulation of calcium, magnesium and phosphorus by early life stages of the air-breathing armoured catfish *Megalechis personata* (siluriformes: callichthyidae). **The Journal of Experimental Biology**, v.202, p.2121-2129, 1999.

MOMMSEN, T.P. Paradigms of growth in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology** (Part B), v.129, p.207-219, 2001.

MOORE, C.A.; PARKIN, C.A.; BIDET, Y.; INGHAM, P.W. A role for the myoblast city homologues Dock1 and Dock5 and the adaptor proteins Crk and Crk-like in zebrafish myoblast fusion. **Development**, v.134, p.3145-3153, 2007.

OBA, E.T., MARIANO, W.S., SANTOS, L.B.S. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIAS, M. (Ed.) **Manejo e sanidade de peixes em cultivo**. Macapá: EMBRAPA Amapá, 2009.

OLSON, E.N.; KLEIN, W.H. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. **Genes & Development**, v.8, p.1-8, 1994.

PARSONS, S.A.; WILKINS, B.J.; BUENO, O.F.; MOKKENTIN, J.D. Altered skeletal muscle phenotypes in calcineurin A and A gene-targeted mice. **Molecular and Cellular Biology**, v.23, n.12, p.4331-4343, 2003.

PELLETIER, D.; BLIER, P.U.; DUTIL, J.D.; GUDERLEY, H. How should enzyme activities be used in fish growth studies? **The Journal of Experimental Biology**, v.198, p.1493-1497, 1995.

POWELL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON, C.P. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.18, p.747-783, 2002.

RESCAN, P.Y. Regulation and functions of myogenic regulatory factors in lower vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology** (part B), v.130, p.1-12, 2001.

RESCAN, P. Y. Muscle growth patterns and regulation during fish ontogeny. **General and Comparative Endocrinology**, v.142, p.111-116, 2005.

RICKER, W.E. **Handbook of computations for biological statistics of fish populations**. Ottawa: Fisheries Research Board of Canada, 1958.

ROARK, A.M.; BJORNDAAL, K.A.; BOLTON, A.B.; LEEUWENBURGH, C. Biochemical indices as correlates of recent growth in juvenile green turtles (*Chelonia*

mydas). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.376, p.59-67, 2009.

RODRIGUES-GALDINO, A.M. **Estadiamento e avaliação da qualidade das larvas do peixe neotropical jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) produzidas sob diferentes temperaturas de incubação**. 2009. 121f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RODRIGUES-GALDINO, A.M.; MAIOLINO, C.V.; FORGATI, M.; DONATTI, L.; MIKOS, J.D.; CARNEIRO, P.C.F.; RIOS, F.S. Development of the neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae) incubated in different temperature regimes. **Zygote**, v.18, p.131-144, 2009.

ROJAS, N.E.T.; ROCHA, O.; AMARAL, J.A.B. O efeito da alcalinidade da água sobre a sobrevivência e o crescimento das larvas do curimatá, *Prochilodus lineatus* (characiformes, prochilodontidae), mantidas em laboratório. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, n.2, p.155-162, 2001.

ROJAS, N.E.T.; ROCHA, O. Influência da alcalinidade da água sobre o crescimento de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 Perciformes, Cichlidae) **Acta scientiarum. Biological sciences**, v.26, n.2, p.163-167, 2004a.

ROJAS, N.E.T.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; ROCHA, O.; SILVA, A.L. Larviculture of *Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758 (Perciformes, Cichlidae) in ponds with different levels of water alkalinity. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v.16, n.4, p.341-349, 2004b.

ROJAS, N.E.T.; ROCHA, O.; MAINARDES-PINTO, C.S.R.; Influência de diferentes níveis de alcalinidade da água de viveiros sobre o crescimento de larvas de *Prochilodus lineatus*. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.30, n.2, p.99-108, 2004c.

SANTOS, V.B. Aspectos morfológicos da musculatura lateral dos peixes. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.33, p.127-135, 2007.

SCHIERHOLT, A.S.; FONSECA, I.; SILVA, P.V.; PAIVA, S.R.; CHAVES, L.C.S.; LOPES, P.S.; FARIA, D.A.; GUIMARÃES, S.E.F. Análise filogenética do gene da miogenina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.1, p.156-162, 2008.

SCHWARTZ, R.J. Quantitation of actin mRNA content in muscle cell culture. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v.29, n.9, p.1014-1020, 1981.

SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, J.I.; BALDISSEROTTO, B. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. **Aquaculture**, v.228, p.279-287, 2003.

SILVA, L.V.F.; GOLOMBIESKI, I.G.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish larvae, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), at different calcium and magnesium concentrations. **Neotropical Ichthyology**, v.3, n.2, p.299-304, 2005.

SILVA, P.; ROWLERSON, A.M.; VALENTE, L.M.P.; OLMEDO, M.; MONTEIRO, R.A.F.; ROCHA, E. Muscle differentiation in blackspot seabream (*Pagellus bogaraveo*, Brunnich): Histochemical and immunohistochemical study of the fibre types. **Tissue and Cell**, v.40, p.447-458, 2008.

STICKLAND, N.C. Growth and development of muscle fibres in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Journal of Anatomy**, v.137, n.2, p.323-333, 1983.

STOIBER, W.; HASLETT, J.R.; WENK, R.; STEINBACHER, P.; GOLLMANN, H.P.; SÄNGER, A.M. Cellularity changes in developing red and white fish muscle at different temperatures: simulating natural environmental conditions for a temperate freshwater cyprinid. **The Journal of Experimental Biology**, v.205, p.2349-2364, 2002.

STORCH, D.; LANNIG, G.; PORTNER, H.O. Temperature-dependent protein synthesis capacities in Antarctic and temperate (North Sea) fish (Zoarcidae). **The Journal of Experimental Biology**, v.208, p.2409-2420, 2005.

TOWNSEND, C.R.; BALDISSEROTTO, B. Survival of silver catfish fingerlings exposed to acute changes of water pH and hardness. **Aquaculture international**, v.9, p.413-419, 2001.

TOWNSEND, C.R.; SILVA, L.V.F.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) larvae exposed to different levels of water hardness. **Aquaculture**, v.215, p.103-108, 2003.

TSENG, D.Y.; CHOU, M.Y.; TSENG, Y.C.; HSIAO, C.D.; HUANG, C.J.; KANEKO, T.; HWANG, P.P. Effects of stanniocalcin 1 on calcium uptake in zebrafish (*Danio rerio*) embryo. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v.296, p.549-557, 2009.

VELLEMAN, S.G. Muscle development in the embryo and hatchling. **Embryo Symposium**. Alberta: 2006, p.1050-1054.

WANG, H.; NOULET, F.; EDMOND-VOVARD, F.; GRAND, F.; DUPREZ, D. BMP signaling at the tips of skeletal muscles regulates the number of fetal muscle progenitors and satellite cells during development. **Developmental Cell**, v.18, p.643-654, 2010.

WEBB, S.E.; MING LI, W.; MILLER, A.L. Calcium signalling during the cleavage period of zebrafish development. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.363, p.1363-1369, 2008.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

WESTERMAN, M.; HOLT, G.J. RNA:DNA ratio during the critical period and early larval growth of the red drum *Sciaenops ocellatus*. **Marine Biology**, v.121, p.1-9, 1994.

WHITAKER, M. Calcium at fertilization and in early development. **Physiological Reviews**, v.86, p.25-88, 2006.

WHITAKER, M. Calcium signalling in early embryos. . **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.363, p.1401-1418, 2008.

WOLPERT, L.; BEDDINGTON, R.; BROCKES, J.; JESSEL, T.; LAWRENSE, P.; MEYEROWITZ, E. **Princípios de biologia do desenvolvimento**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

ZEMAN, R.J.; KAMEYAMA, T.; BERNSTEIN, K.M.P.; ETLINGER, J.D. Regulation of protein degradation in muscle by calcium. **The Journal of Biological Chemistry**, v.260, n.25, p.13619-13624, 1985.

ANEXO 1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEAA)



Nº 316

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEAA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEAA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.019887/2008-05

APROVADO:

17/06/2008 – R.O. 05/2008

TÍTULO: Desenvolvimento embrionário e pós-embrionário de peixes: descrição morfológica e estudo dos efeitos das condições ambientais no desenvolvimento de peixes

AUTORES: Flavia Sant'Anna Rios, Lucélia Donatti, Aiana Marielle R. Galdino, Paulo César F. Carneiro, Peter Kirschnik, Lúcia Elvira Álvares, Mariana Forgati, Camila Valente Maiolino

DEPARTAMENTO:

Biologia Celular

Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEAA

ANEXO 2

TABELA 01. PERÍODOS E ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO DE *Rhamdia quelen* INCUBADOS A 21°C, 24°C, 27°C E 30°C.

Período	Estádio	hpf 21°C	hpf 24 °C	hpf 27 °C	hpf 30 °C	Descrição
Embrão	Zigoto	1	0:00	0:00	0:00	1 célula – Citoplasma ativo se desloca em direção ao pólo animal e formação da membrana de fertilização
	Clivagem	2	0:40	0:40	*	2 células – Clivagem meroblástica
		3	1:00	1:00	1:00	* 4 células– matriz de 2 x 2 blastômeros
		4	1:30	1:15	1:10	1:00 8 células – matriz de 2 x 4 blastômeros
		5	2:00	1:30	1:20	1:10 16 células – matriz de 4 x 4 blastômeros
		6	2:20	1:40	1:30	1:20 32 células – matriz de 4 x 8 blastômeros, células começam a compactar
		7	2:40	1:50	1:45	1:30 64 células – 2 camadas de 32 blastômeros, formas YSL
Blástula		8	3:00	2:00	2:00	1:45 Blástula inicial - 128-256 blastômeros, formando uma semi-esfera
		9	4:00	3:00	2:30	2:00 Blástula média – 512 ou mais blastômeros
		10	5:00	4:00	3:00	2:30 Blástula tardia – Achatamento do blastodisco
		11	5:30	5:00	4:45	4:00 30% Epibolia - Blastoderma altamente achatado com espessura uniforme; margem chega a 30% da distância entre os pólos animal e vegetal
		12	6:00	6:00	5h15	5:00 50% Epibolia – Margens do blastoderma atingem 50% da distância entre os pólos animal e vegetal; anel germinativo e, posteriormente, o escudo embrionário é visível
Gástrula		13	9:30	8:30	8:00	5:30 75% Epibolia – Blastoderma envolve 75-80% do embrião, lado dorsal é mais espesso
		14	10:00	7:30	7:00	6:00 Tampão de vitelo – Tampão de vitelo no pólo vegetal (blastoporo)
		15	11:00	9:00	8:00	7:00 Nêurula - Blastoderma cobre totalmente o tampão de vitelo, fechando o blastoporo; sulco neural visível; embrião toma-se elíptico
	Segmentação	16	11:30	9:30	8:30	7:30 Somitos 2-3 - Os primeiros pares de somitos e a vesícula óptica são visíveis
		17	15:00	11:15	9:00	8:00 6 somitos – Neurômeros cerebrais, vesículas ópticas, as narinas (órgão olfativo primordial), e notocorda visíveis
		18	15:30	12:00	10:00	8:30 10 somitos - Vesícula de Kupfer e formação da placa ótica. Vesícula óptica mais evidente.
		19	16:30	13:00	11:00	8:00 14 somitos – Mesencéfalo ligeiramente proeminente, lentes ópticas, início da formação da extensão de vitelo.

20	17:30	14:00	11:30	10:30	18 somitos – Vesícula ótica, pelo menos 3 neurômeros no rombencéfalo, broto da cauda começa a projetar-se, primeiras contrações musculares
21	20:30	15:30	15:00	12:30	25 somitos – somitos (miômeros) em "forma de V", flexões laterais do corpo, cauda e extensão de vitelo alongadas, otólitos na vesícula ótica, aorta dorsal visível, vesícula de Kupfer desapareceu
22	26:00	17:00	16:00	14:30	Faringula inicial - ~ 30 miômeros, motilidade intensa (embrião em rotação no interior do córion), desenvolvimento do intestino anterior (mas a boca e o ânus permanecem fechados), cavidade pericárdica visível, mesencéfalo dividido em dois hemisférios
23	40:00	19:00	18:00	16:00	Faringula média – batimentos cardíacos (85-89 bpm), circulação fraca, intestino médio visível, extensão de vitelo desapareceu, nadadeira embrionária (dorsal contínua com caudal e anal)
24	41:00	21:00	18:00	18:00	Faringula tardia – Circulação aferente e eferente mais intensas (~ 80 bpm), ~ 40 miômeros, embriões dobrados (1/2 tronco) no interior do córion; córion se deforma com os movimentos do embrião, as aberturas correspondentes à boca e opérculo são visíveis, intestino posterior visível
25	43:00	26:00	20:00	19:00	Eclosão - motilidade baixa pouco antes da eclosão, ~ 100 bpm, sem pigmentação.
26	*	36:00	*	*	Larva inicial – Olhos pigmentados, a boca é uma abertura elíptica, primórdios dos barbilhões (3 pares), poro anal e opérculos abertos, bolsas faríngeas começam a desenvolver, neuromastos (estruturas da linha lateral) presentes no tronco e na região cefálica.
27	*	66:00	*	*	Larva média - Corpo torna-se pigmentado, barbilhões com pequenas e numerosas protuberâncias (botões gustativos), barbilhões maxilar maiores que os mentonianos, lábios inferior e superior tornam-se definidos
28	*	90:00	*	*	Larva tardia – Barbilhões bem desenvolvidos, botões gustativos nos barbilhões e lábios, maxilar projetado, narinas profundas com células ciliadas, saco vitelino muito reduzido, bexiga natatória inflada, início da alimentação exógena
29	*	7 dpf	*	*	Saco vitelino ausente, barbilhões e nadadeiras bem desenvolvidas.
30	*	21 dpf	*	*	Aspecto semelhante ao adulto, poros do sistema de linha lateral

NOTA: hpf = horas após a fertilização em; dpf = dias após a fertilização; YSL = camada sincicial de vitelo; * = não analisado.

ANEXO 3

INCLUSÃO EM PARAPLAST

- Amostras devem ser estocadas em PBS 0,1M pH 7,2
- Lavar as amostras 3 x em água destilada

DESIDRATAÇÃO (necessário, uma vez que o *paraplast* não é miscível em água

- . Alcool 50 % - 15 minutos (se precisar pode deixar estocado neste)
- . Alcool 70 % - 15 minutos
- . Alcool 80 % - 15 minutos
- . Alcool 90 % - 15 minutos
- . Alcool 95 % - 15 minutos
- . Alcool 100 % I - 15 minutos (absoluto / P.A.)
- . Alcool 70 % II - 15 minutos
- . Alcool 100% + xilol (1:1) – 10 minutos
- . Xilo I – 5 minutos
- . Xilol II – 5 minutos

INCLUSÃO

Deixar 1 hora no *paraplast* em estufa à 58°C (pode ser no máximo até 60°C)

EMBLOCAGEM

- . No período em que as amostras estão incluindo no *paraplast*, devem ser preparado as forminhas de papel
- . Encher rapidamente a forminha de papel com o *paraplast* liquido e com o auxilio de

uma pinça retirar as amostras das forminhas de alumínio e as transferir para as de papel

- . Deixar secar bem em temperatura ambiente (no mínimo 24 horas)
- . Trimar os blocos em formato de pirâmide e com o auxílio de uma lamparina, colar os bloquinhos em pequenos pedaços de madeira
- . Armazenar à -4°C (para que o bloco não se solte da madeira no momento em que estiver o cortando)

OBSERVAÇÕES:

No dia anterior, deve ser verificado a temperatura da estufa (a temperatura não deve diferir muito de 58°C, pois abaixo disso não derreterá o *paraplast* e acima de 60°C altera irreversivelmente a propriedade desta resina)

Deve ainda verificar a qualidade do *paraplast* de uso que permanece na estufa, uma vez que larvas são muito pequenas, o *paraplast* não poderá apresentar nenhuma sujeira.

.

ANEXO 4

COLORAÇÃO HEMATOXILINA/EOSINA (H.E.) EM PARAFINA

Deixar os cortes secar bem (~24h, se necessário por na estufa - 37°C 30 min)

1) HIDRATAÇÃO

- . Xilol I – 5 min
- . Xilo II – 5 min
- . Alcool 100% - 3 min
- . Alcool 90% - 3 min
- . Alcool 70% - 3 min
- . Alcool 50% - 3 min
- . H₂O_D – 3 min

2) COLORAÇÃO

- . Hematoxilina – 3-5 min (depende do estado da solução – nova/velha)
- . Lavar em água corrente
- . Eosina – 1 min (ou mais - depende do estado da solução)
- . Lavar em água corrente
- . Lavar novamente em água destilada (não é necessário)

3) DESIDRATAÇÃO

- . Alcool 95% - 1x 1 min
- . Alcool 100% - 2x 3 min
- . Alcool + Xilol (1:1) – 1x 3 min
- . Xilol – 2x 3 min

4) MONTAGEM DA LÂMINA

- . Limpar bem as lamínulas
- . Por sobre a lamínula o *permaunt*
- . Soltar a lamínula sobre a lâmina
- . Etiquetar a lâmina
- . Deixar secar na horizontal por 24h